

Medizinische Fakultät  
der  
Universität Duisburg-Essen

Aus der Klinik für Gastroenterologie und Hepatologie

Über die Bedeutung von depressionsassoziierten Genen in neuronalen *in vitro*-Systemen

I n a u g u r a l – D i s s e r t a t i o n  
zur  
Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften in der Medizin  
durch die Medizinische Fakultät  
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von  
Anastasia Hübener  
aus Tscheljabinsk  
2016

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer  
1. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. J. F. Schlaak  
2. Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. med. E. Gulbins  
3. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. N. Scherbaum

Tag der mündlichen Prüfung: 25. Januar 2017

## Publikationen

Teile der vorliegenden Dissertation wurden zuvor publiziert oder auf Kongressen präsentiert.

### 1. Publikation

Hoyo-Becerra C<sup>\*</sup>, Huebener A<sup>\*</sup>, Trippler M, Lutterbeck M, Liu ZJ, Truebner K, Bajajowski T, Gerken G, Hermann DM, Schlaak JF (2103): Concomitant interferon alpha stimulation and TLR3 activation induces neuronal expression of depression-related genes that are elevated in the brain of suicidal persons. PLoS One, 8(12), e83149.  
(<sup>\*</sup> Ko-Erstautoren)

### 2. Publierte Vorträge und wissenschaftliche Poster

Huebener, A.; Hoyo-Becerra, C.; Real, C. I.; Trippler, M.; Poggenpohl, L.; Gerken, G.; Schlaak, J. F. (2012): Interferon-Alpha Treatment Induces The Expression of Depression-Related Genes In Vivo and In Vitro. Hepatology, 56, 1032A.

Huebener, A.; Hoyo-Becerra, C.; Real, C. I.; Trippler, M.; Poggenpohl, L.; Gerken, G.; Schlaak, J. F. (2012): Interferon-Alpha Treatment Differentially Modifies the Expression of Depression-Related Interferon-Inducible Genes in Vivo and in Vitro. Z Gastroenterol, 50, K001.

Hoyo-Becerra, C.; Huebener, A.; Trippler, M.; Poggenpohl, L.; Gerken, G.; Schlaak, J. F. (2012): Characterization of Interferon-Alpha and Poly I:C Regulation of Interferon- Inducible Genes in Hippocampal and Prefrontal Cortex Neurons. Hepatology, 56, 702A.

Hoyo-Becerra, C.; Huebener, A.; Trippler, M.; Poggenpohl, L.; Gerken, G.; Schlaak, J.F. (2012): Interferon-Alpha Treatment Differentially Regulates the Expression of Interferon-Inducible Genes in Hippocampal and Prefrontal Cortex Neurons. Journal of Hepatology, 56, S348-S349.

Hoyo-Becerra, C.; Huebener, A.; Trippler, M.; Poggenpohl, L.; Gerken, G.; Schlaak, J. F. (2012): Differential Regulation of Depression Associated Interferon-Inducible Genes Identified in HCV Patients During IFN-Alpha Therapy in Hippocampal and Prefrontal Cortex Mouse Neurons. Z Gastroenterol, 50, K056.

# Inhaltsverzeichnis

Publikationen .....	3
1 Einleitung.....	6
1.1 Hepatitis-C-Virus.....	6
1.2 Behandlung der chronischen HCV-Infektion .....	7
1.3 Interferone .....	9
1.3.1 IFN-Induktion bei Virusinfektion.....	10
1.3.2 IFN-abhängige JAK-STAT-Signalkaskade .....	12
1.3.3 Eigenschaften der Typ-I-Interferone .....	14
1.3.4 Interferon-stimulierbare Gene (ISG) mit antiviralen Eigenschaften .....	14
1.3.5 Depressionsassoziierte Interferon-Antwortgene.....	16
1.4 Neuro-psychiatrische Symptome bei chronisch HCV-Infizierten .....	18
1.5 Mechanismen neuro-psychiatrischer Nebenwirkungen von IFN- $\alpha$ .....	20
1.6 RNA-Interferenz (RNAi).....	26
1.7 Neuroanatomie der Depression und <i>in vitro</i> -Techniken neuronalen Zellkultur .....	28
2 Ziele .....	30
3 Material und Methoden .....	31
3.1 Material.....	31
3.1.1 Geräte.....	32
3.1.2 Kits .....	33
3.1.3 Oligonukleotide .....	33
3.1.4 Chemische Substanzen und Puffer .....	34
3.1.5 Größenstandards .....	36
3.1.6 Zellkulturmedien und Reagenzien.....	36
3.1.7 Zellkulturlinie .....	36
3.1.8 Versuchstiere .....	36
3.2 Methoden der Zellkultur .....	37
3.2.1 Kultivierung der Zelllinie HT22.....	37
3.2.2 Passagieren der Zellen .....	37
3.2.3 Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung .....	37
3.2.4 Einfrieren und Auftauen der Zelllinie HT22 .....	38
3.2.5 Isolierung von primären Neuronen aus dem Hippocampus und dem präfrontalen Kortex .....	38
3.2.6 Kultivierung von primären hippocampalen und kortikalen Neuronen .....	39
3.3 <i>In vitro</i> -Experimente.....	40
3.3.1 Stimulation von HT22 Zellen mit mIFN- $\alpha$ .....	40
3.3.2 <i>In vitro</i> -Stimulation von primären hippocampalen und kortikalen Neuronen.....	40
3.4 Molekularbiologische Methoden .....	41
3.4.1 RNA-Isolation aus Zellen .....	41
3.4.2 Quantitative Real-Time-RT-PCR .....	41
3.4.3 siRNA-vermittelte Genregulation <i>in vitro</i> .....	43
3.5 Proteinbiochemische Methoden .....	44
3.5.1 Gewinnung von Proteinproben.....	44
3.5.2 Proteinbestimmung mittels BCA-Tests .....	45
3.5.3 Western-Blot (Immunoblot) .....	45
3.5.4 Wiederverwendung der Western-Blot-Membranen („Reproben“).....	47
3.5.5 Zytokin-Array-Assay .....	47

3.6	Statistische Auswertung .....	48
4	Ergebnisse.....	49
4.1	Überexpression der „Depressionsgene“ in einer hippocampalen Zelllinie HT22 .....	49
4.2	mIFN- $\alpha$ und Poly(I:C)-vermittelte Überexpression der „Depressionsgene“ in murinen Primärneuronen .....	51
4.2.1	Überexpression depressionsassoziiierter IFN-Antwortgene in hippocampalen und kortikalen Primärneuronen .....	54
4.3	Anstieg von proinflammatorischen Zytokinen durch mIFN- $\alpha$ und Poly(I:C).....	56
4.4	mIFN- $\alpha$ und Poly(I:C) beeinflusst die serotonerge und dopaminerge Aktivität .....	59
4.5	mIFN- $\alpha$ /Poly(I:C)-vermittelte STAT1-Aktivierung und Folgen der RNAi-vermittelten STAT1-Suppression .....	60
4.5.1	siRNA-vermittelte STAT1-Suppression in primären Neuronen und ihre Stimulierbarkeit mit IFN- $\alpha$ /Poly(I:C).....	62
4.6	STAT1-„Knockdown“ beeinflusst die Expression der „Depressionsgene“ negativ .....	65
4.6.1	mIFN/Poly(I:C)-Stimulierbarkeit der „Depressionsgene“ in STAT1-supprimierten Neuronen .....	67
4.7	Die STAT1-Suppression beeinflusst die Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen.....	69
4.8	Die STAT1-Suppression steuert die Aktivität des serotonergen Systems .....	72
5	Diskussion .....	75
5.1	IFN-vermittelte Hypersensitivität der „Depressionsgene“ in hippocampaler und kortikaler Zellkultur als möglicher Marker für eine bevorstehende Depression.....	76
5.2	IFN-vermittelte Induktion der proinflammatorischen Zytokine führt zur Dysregulation der Neurotransmitter-Biosynthese.....	78
5.3	STAT1 als mögliches molekulares Target zur antiinflammatorischen Wirkung im Gehirn.....	83
6	Zusammenfassung .....	88
7	Literaturverzeichnis .....	89
8	Anhang.....	95
8.1	Abkürzungsverzeichnis .....	95
8.2	Abbildungsverzeichnis .....	96
8.3	Tabellenverzeichnis .....	97
9	Danksagung .....	98
10	Lebenslauf .....	99

# 1 Einleitung

Die Hepatitis-C-Virus-Infektion (HCV) ist ein globales Gesundheitsproblem, welches nach Schätzungen der WHO rund 130 bis 150 Millionen Menschen weltweit betrifft (WHO, 2015). Bis zu 50-85% der HCV-Infizierten entwickeln die chronische Hepatitis C, ein Krankheitszustand mit ernststen klinischen Folgen, einschließlich der Leberfibrose, der Leberzirrhose und dem Leberzellkarzinom (Abu Sin, 2015). Für die Therapie der HCV-Infektion sind mehrere direkt antiviral wirksame Substanzen sowie pegyliertes Interferon alpha (PEG-IFN- $\alpha$ ) in Kombination mit Ribavirin zugelassen (C. Sarrazin et al., 2015). Für verschiedene Konstellationen stehen dabei mehrere Therapieoptionen zur Verfügung. Bei der Wahl unter den Therapieoptionen sind die Effektivität, mögliche Nebenwirkung bzw. Kontraindikationen sowie die Therapiedauer zu beachten.

IFN- $\alpha$  ist ein Zytokin des angeborenen Immunsystems und besitzt direkte antivirale, immunmodulatorische und antiproliferative Eigenschaften und ist bekannt dafür, bei der o.g. Therapie häufig schwere Nebenwirkungen hervorzurufen. Es wurde bereits gezeigt, dass die IFN- $\alpha$ -Therapie durch physische, verhaltens- und neuropsychiatrische Nebenwirkungen, einschließlich grippeähnlichen Symptomen Müdigkeit, Schlaflosigkeit, Depressionen, Schilddrüsenprobleme und Reizbarkeit erschwert wird. So verursacht die IFN- $\alpha$ -Therapie bei etwa 30% der Patienten schwere Depressionen, welche oftmals zum Abbruch der Therapie führen. In seltenen Fällen kommt es zu absichtlichen Selbstverletzungen oder Suizidversuchen. Darüber hinaus können vorbestehende depressive Episoden und affektive Störungen durch die IFN- $\alpha$  Therapie verschlechtert werden. Das bedeutet, dass HCV-Patienten mit psychiatrischen Beschwerden wegen des Risikos einer verminderten Therapie-Compliance erst nach deren Behandlung mit IFN- $\alpha$  therapiert werden sollten. Dies hat durch Unterbrechung der Behandlung oder Senkung der Dosis gravierende Auswirkungen auf den therapeutischen Effekt. Die Reduktion oder gar Beseitigung von Nebenwirkungen der IFN-Therapie ist essentiell für den Therapieerfolg. Die Identifizierung genetischer und molekularer Risikofaktoren, die zu neuropsychiatrischen Symptomen durch IFN- $\alpha$  führen, kann helfen, gefährdete HCV-Patienten früh zu erkennen und schwerwiegende depressive Komplikationen zu eliminieren.

## 1.1 Hepatitis-C-Virus

Im Jahr 1988 identifizierten Houghton und Kollegen das Hepatitis-C-Virus (HCV) mit molekularbiologischen Methoden (Choo et al., 1989). Das Hepatitis-C-Virus gehört der Gattung Hepacivirus aus der Familie der Flaviviridae an und ist ein behülltes, einzelsträngiges RNA-Virus mit einem Plusstrang-Genom. Infolge einer hohen Mutationsrate weist es eine starke genetische Variabilität auf. Es wurden sechs Genotypen und weit mehr als 50 Subtypen des Hepatitis-C-Virus beschrieben. Die weltweite Prävalenz haben die Genotypen 1, 2 und 3 (Subtyp 1a und 1b), wobei in Europa vorrangig der Subtyp 1b und in den USA vorrangig der Subtyp 1a zu finden ist. Der Genotyp 4 tritt

insbesondere in Nordafrika und im mittleren Osten auf, während die Genotypen 5 und 6 primär in Südafrika bzw. Ostasien zu finden sind (zusammengefasst in (Wedemeyer, 2012)).

Eine HCV-Infektion kann in etwa 25 % der Fälle eine akute Hepatitis verursachen, die bei 50-85 % der Patienten einen chronischen Verlauf nimmt (Robert-Koch-Institut, 2014). Weltweit leiden schätzungsweise ungefähr 130 bis 150 Millionen Menschen an einer chronischen HCV-Infektion, von denen jährlich ca. 500.000 Menschen an den Folgen der HCV-Erkrankung sterben. Die Zahl der HCV-Neuinfektionen liegt bei drei bis vier Millionen Menschen jährlich. Somit ist die HCV-Infektion eine der weltweit häufigsten Ursachen einer chronischen Lebererkrankung (WHO, 2015). Bei der regionalen Verbreitung des HCV spielt der Infektionsweg eine entscheidende Rolle. Bis zur Einführung des routinemäßigen Screenings von Blutprodukten in den 1990er Jahren, waren bis zu 70% der HCV-Infektionen in den Industrieländern bedingt durch Bluttransfusionen und Nadelstichverletzungen. Aktuelle Risiken der HCV-Infektion sind Drogenkonsum und zu einem geringen Teil unsaubere medizinische Eingriffe sowie Tätowierungen, Piercings und Akupunkturbehandlungen.

## 1.2 Behandlung der chronischen HCV-Infektion

Bereits vor Entdeckung des HCV wurde versucht, die Non-A-non-B-Hepatitis mit IFN- $\alpha$  zu therapieren (Hoofnagle et al., 1986). Eine erfolgreiche Behandlung wird als ein anhaltendes virologisches Ansprechen (sustained virological response, SVR) definiert, also eine dauerhafte Negativierung der HCV-RNA im Serum sechs Monate nach Therapieende (Nachweisgrenze  $\leq 50$  IE/ml). Eine SVR ist mit einer Heilung der Lebererkrankung assoziiert. Dabei war es wichtig eine RVR (rapid virologic response) festzustellen. Sie ist erreicht, wenn der Nachweis der HCV-RNA in Woche 4 nach Therapiebeginn negativ ist. Das Therapieansprechen zur Woche 12 wird als frühes virologisches Ansprechen (early virological response, EVR) bezeichnet. Zunächst wurde das Interferon dreimal wöchentlich für 24 Wochen verabreicht; eine SVR gelang damit nur bei etwa 10% der Patienten. Eine deutlich höhere SVR-Rate wurde durch eine Verlängerung der Therapie auf 48 Wochen sowie durch die Einführung der Kombinationstherapie mit IFN- $\alpha$  und Ribavirin erreicht. Seit 2002 bestand die Standardtherapie aus einer Kombination aus pegyliertem Interferon alpha (PEG-IFN- $\alpha$ ) mit Ribavirin. Bei pegyliertem Interferon handelt es sich um an IFN- $\alpha$ -Moleküle gekoppelte Polyethylenglykolmoleküle mit unterschiedlichen Größen. Die Pegylierung verleiht dem IFN-Molekül mehrere positive Eigenschaften, wie das Erhalten eines konstanten Blutspiegels, welcher die antivirale Wirksamkeit erhöht und Nebenwirkungen verringert, sowie eine längere Halbwertszeit und eine verbesserte Verträglichkeit (Chevaliez et al., 2007). Kommerziell erhältlich sind zwei pegylierte Interferone, PEG-IFN- $\alpha$ -2a (40 kDa, 77 Stunden) und PEG-IFN- $\alpha$ -2b (12 kDa, 40 Stunden), die sich vor allem in ihren Molekularmassen und ihren Halbwertszeiten unterscheiden. Ribavirin ist ein Guanosin-Analogon mit einem breiten Wirkungsspektrum gegenüber den

DNA- und RNA-Viren. Es hemmt dezent und vorübergehend die HCV-Replikation *in vivo* und verhindert Rückfälle während der IFN-Ribavirin-Kombinationstherapie effizient (Chevaliez & Pawlotsky, 2007). Der genaue Mechanismus ist jedoch unklar. Mehreren Berichten zufolge wirkt Ribavirin als Immunmodulator, indem es die Ausschüttung von Th1-Helferzellen-Zytokinen (Interleukin-2 (IL-2), Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) und Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)) bei gleichzeitiger Unterdrückung der Th2-Zytokin-Produktion fördert. Vermutlich verbessern diese Eigenschaften die Wirkung des Interferons auf zellulärer Ebene (Thomas et al., 2011).

Durch die Einführung des PEG-IFN- $\alpha$  wurden die Ergebnisse gegenüber einer Therapie mit dem normalen Interferon insbesondere bei Patienten mit einer Genotyp-1-Infektion deutlich verbessert. Bis zu 50 % der HCV-Patienten mit einer Genotyp-1-Virusinfektion und bis zu 80 % der Patienten mit einer Genotyp-2 und -3-Virusinfektion konnten geheilt werden. Die Heilungsrate bei Patienten mit dem HCV-Genotyp-4 lag bei ca. 50 % (Antaki et al., 2010). Die Therapiedauer wurde unter anderem durch den HCV-Genotyp bestimmt und lag bei einer 16- bis 72-wöchigen Behandlung mit regelmäßigen Kontrollen des Therapieerfolges. Eine Individualisierung der Behandlungsdauer, basierend auf der Ausgangsviruslast, dem Stadium der Lebererkrankung und der initialen Ansprechkinetik während der ersten Behandlungswochen wurde empfohlen (Wedemeyer, 2012).

Seit 2011 wurden in Deutschland zwei neue Antiinfektiva (DAA, directly acting antivirals), Boceprevir und Telaprevir, als HCV-Proteaseinhibitoren für die Behandlung von chronischen Infektionen mit dem HCV Genotyp-1 zugelassen. Beide Substanzen greifen in den Replikationszyklus des Virus ein, indem sie Komplexe mit dem NS3-Protein bzw. der NS3/4A-Protease des Virus bilden. Somit ändert sich die Standardtherapie für Patienten mit einer HCV-Genotyp-1-Infektion im Rahmen einer Triple-Therapie in Kombination mit PEG-IFN und Ribavirin. Die Triple-Therapie bewährte sich mit guten Heilungsprognosen (SVR >90 %) im Vergleich zur dualen Kombinationstherapie mit PEG-IFN und Ribavirin allein (C. Sarrazin et al., 2012). In der Praxis sollte allerdings seit 2014 mit der Einführung von HCV-Replikationshemmern wie dem nukleos(t)idische Polymerase (NS5B)-Inhibitor Sofosbuvir, dem NS5A-Inhibitor Daclatasvir sowie dem NS3/4A-Protease-Inhibitor Simeprevir die Triple-Therapie mit DAAs der ersten Generation (Boceprevir und Telaprevir) wegen starker Nebenwirkungen, der fehlenden Wirksamkeit für die Genotypen 2-6 und der hohen Resistenzbildung nicht mehr empfohlen werden (C. Sarrazin, Berg, T., Buggisch, P., Dollinger, M., Hinrichsen, H., Hüppe, D., 2014). Seit Anfang 2015 erlebt die Hepatitis-C-Therapie eine revolutionäre Entwicklung. Verschiedene neue NS5B/NS5A/NS3 Protease-Inhibitoren und nicht-nukleosidische Polymerase-Inhibitoren sind bereits zugelassen oder stehen kurz vor der europäischen Zulassung. Gemäß der Leitlinie „Aktuelle Empfehlung zur Therapie der chronischen Hepatitis C“ sind PEG-IFN, Ribavirin sowie mehrere direkt antiviral wirksame Substanzen zur HCV-Therapie zugelassen. Somit stehen mehrere Therapieoptionen zur Verfügung. Bei der Wahl der



Optionen sind die Effektivität, mögliche Nebenwirkungen bzw. Kontraindikationen sowie die Therapiedauer zu beachten (C. Sarrazin & Berg, 2015).

### 1.3 Interferone

Interferone (IFN) sind eine Familie von natürlichen (Glyko)-Proteinen, die 1957 erstmals beschrieben wurden (Isaacs et al., 1957). Sie werden durch Zellen des angeborenen und des erworbenen (adaptiven) Immunsystems, durch Nicht-Immunzellen, wie Fibroblasten und Epithelzellen, aber auch Tumorzellen, als Reaktion auf infektiöse Organismen (Viren, Bakterien, Pilze und Parasiten) ausgeschüttet. Sie sind potente Immunmodulatoren mit direkten antiviralen und antiproliferativen Eigenschaften. Die *Internal Society for Interferon and Cytokine Research* (ISICR) hat drei Hauptklassen menschlicher Interferone definiert: Typ-I-IFNe (IFNA und 13 humanen Subtypen IFNB1, IFNW1, IFNK, IFNE, IFNL), Typ-II-IFNe (IFNG) und eine weitere Klasse der Typ-I-ähnlichen humanen IFNe (Typ-III-IFNe): IFNL1 (IL29), IFNL2 (IL28A) und IFNL3 (IL28B).

Typ-I-Interferone bilden eine Superfamilie von angeborenen Zytokinen, die IFNA, die 12 humane Subtypen umfasst und einen IFNB-Typ. IFNA, IFNB1, IFNW1, IFNK und IFNE sind im Menschen exprimiert. Alle IFN- $\alpha$ -Subtypen werden durch Leukozyten sezerniert, während IFN-beta auch von den Fibroblasten erzeugt wird. Alle Typ-I-IFNe binden an ihren spezifischen Rezeptorkomplex, einem Heterodimer aus einer  $\alpha$ -Kette (IFNAR1) und einer  $\beta$ -Kette (IFNAR2). Die IFNARs sind nahezu auf allen kernhaltigen Zellen repräsentiert.

Im Gegensatz zum Typ-I-IFNe gibt es nur ein einziges Typ-II-IFN, das IFN- $\gamma$ , das ausschließlich durch Immunzellen nach Stimulation durch Fremddantigene oder Mitogene in frühen Stadien der angeborenen Immunantwort sezerniert wird, wie beispielsweise durch aktivierte T-Zellen und natürliche Killerzellen (NK). Typ-II-IFNe binden als Homodimer an einen spezifischen tetrameren Rezeptorkomplex bestehend aus zwei Untereinheiten, IFN- $\gamma$ -Rezeptor-1 und -2 (IFNGR1 und IFNGR2). Auch Typ-II-IFN-Rezeptoren haben eine breite Gewebeverteilung, so dass fast alle Zellen auf Typ-II-IFNe ansprechen.

Typ-III-IFNe binden an einen spezifischen heterodimeren Rezeptorkomplex bestehend aus zwei Ketten, der IFN-lambda-Rezeptor-1- (IFNL1) und der Interleukin-10-Rezeptor-2- (IL10RB) Kette (Abbildung 1.2). Wohingegen IL10RB weit auf allen Zelltypen verbreitet sind, wird die Expression des IFNL1 weitgehend auf Epithelzellen beschränkt. Folglich reagieren viele Zellen entweder sehr schwach oder überhaupt nicht auf Typ-III-IFNe. Sobald IFNe an ihre zugehörigen Oberflächenrezeptoren binden, wird ein Signal innerhalb der Zellen über den JAK-STAT-Signalweg (Janus activated kinase (JAK)/Signal transduced and activators of transcription (STAT)) ausgelöst, wie in der Abbildung 1.2 beschrieben ist (Chevaliez & Pawlotsky, 2007).

### 1.3.1 IFN-Induktion bei Virusinfektion

Die Antwort des angeborenen Immunsystems auf eine Vielzahl eindringender Viren ist die Ausschüttung von IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  und IFN- $\lambda$ . Die meisten Wirtszellen erkennen während der Replikation oder der Transkription eine fremde Virus-RNA aufgrund der Anwesenheit der intrazellulären dsRNA-Strukturen. Zwei wichtige Wege virale Genome zu detektieren und Typ-I- und Typ-III-IFNe auszuschütten wurden bereits beschrieben: Der Toll-like-Rezeptor (TLR)-abhängige Weg und der zytosolische Weg durch Bindung der viralen RNA durch den RIG-I (retinoic acid inducible gene I) -ähnlichen Helikase-Rezeptor (RLR) und an das Melanom-Differenzierungsantigen 5 (MDA5) (zusammengefasst in (Heim, 2012)), (Abbildung 1.1). TLRs sind an der Zelloberfläche und in Endosomen lokalisiert, während RLRs im Zytoplasma ubiquitär exprimiert sind und ausschließlich virale Strukturen erkennen. Die RLR-Aktivierung führt sowohl zur Produktion von Typ-I- als auch Typ-III-IFNe. Diese Produktion scheint durch einen gemeinsamen Mechanismus reguliert zu sein (Chevaliez & Pawlotsky, 2007). Die Typ-I-IFN-Induktion durch Virusinfektion ist in Abbildung 1.1 schematisch dargestellt. IFNe werden über eine auto- und parakrine Sekretion innerhalb von wenigen Stunden nach einer Virusinfektion ausgeschüttet. Die IFNe wirken somit auf die absondernden Zellen selbst (autokrin) sowohl direkt als auch auf die Zellen in der unmittelbaren Umgebung (parakrin). Außerdem ist ihre Wirkweise dual: Sie induzieren einen antiviralen Zellzustand und sie erleichtern die Beseitigung der infizierten Zellen durch die Aktivierung der Apoptose in Synergie mit anderen pro-apoptotischen Zytokinen, wie den TNF-Familienmitgliedern, abhängig von der intrazellulären Virus-dsRNA-Last (Clemens, 2003).

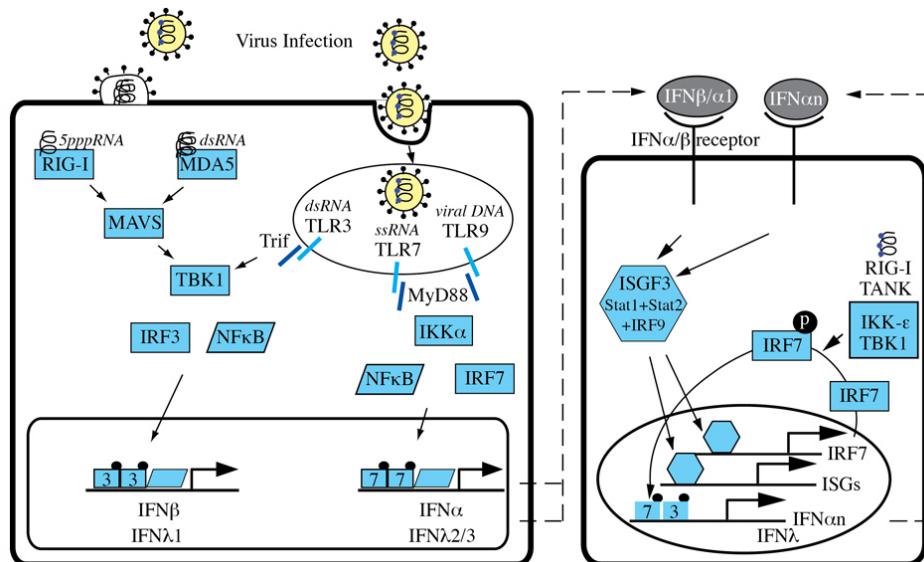


Abbildung 1.1: Typ-I-IFN-Induktion und -Signalkaskade. Virale Infektionen werden durch zwei wichtige Signalwege erkannt: der Toll-like Rezeptor (TLR)-abhängige Weg und der zytosolische Weg durch Bindung der viralen RNA am RIG-I (retinoic acid inducible gene I)-ähnlichen Helikase-Rezeptor (RLR) und an das Melanom-Differenzierungsantigen 5 (MDA5). RIG-I und MDA5 wechselwirken durch MAVS und TBK1, um die Transkriptionsfaktoren IRF3 und NF- $\kappa$ B zu aktivieren. Die TLR3-Signalübertragung hängt von den Adaptern TRIF und TBK1 ab, um IRF3 und NF- $\kappa$ B zu aktivieren. TLR7 und TLR9 nutzen den MyD88-IKK $\alpha$ -Signalweg zur IFN-Gentranskription (Heim, 2012).

### IFN-Induktion über den TLR-Signalweg

TLRs sind Strukturen des angeborenen Abwehrsystems und gehören zu einer Gruppe von Rezeptoren, den PRRs (*pattern-recognition receptors*), die mikrobielle Strukturen PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*) erkennen. PAMPs kommen ausschließlich auf oder in Krankheitserregern vor. Sie werden von TLRs erkannt und lösen eine Signalkaskade aus, die zur Abwehr dieses Krankheitserregers dient. Es gibt mindestens 10 humane TLRs, von denen drei an der Erkennung von Virusinfektionen beteiligt sind: TLR3, TLR7 und TLR9. Während die meisten TLRs auf der Zelloberfläche verschiedener Immunzellen, wie Makrophagen, dendritischen Zellen, B-Zellen und auch Fibroblasten und epithelialen Zellen exprimiert werden, um bakterielle Komponenten zu erkennen, sind TLR3, TLR7 und TLR9 in den Endosomen der Zelle lokalisiert. TLR3 erkennt dsRNA (z.B. HCV-RNA), TLR7 erkennt ssRNA und TLR9 tritt in Wechselwirkung mit nicht-methylierter DNA mit CpG-Motiven auf (Heim, 2012).

Eine virusspezifische Aktivierung von TLRs löst Signalkaskaden aus, die mit der Aktivierung des nuklearen Faktors  $\kappa B$  (NF $\kappa B$ ) und verschiedenen Interferon-Regulationsfaktoren, wie IRF3 und IRF7, verbunden sind (Abbildung 1.1). IRF3 wird in den meisten Zellen konstitutiv exprimiert, wohingegen IRF7 auf einem niedrigen Niveau, jedoch nach Stimulation mit Typ-I-IFN stark erhöht exprimiert wird. Die Induktion des TLR3-Signalweges führt zur IRF3-Phosphorylierung und Aktivierung des NF $\kappa B$  über das Adapterprotein TRIF und die Kinase TBK1. Dadurch wird eine TRIF-vermittelte Genexpression sowie die Induktion von proinflammatorischen Chemokinen und Zytokinen, wie TNF, Interleukin-6 (IL6), Chemokine (C-C motif) Ligand 5 (CCL5), Chemokine (C-X-C motif) ligand 10 (CXCL10/IP10) und IFN- $\beta$  ausgelöst. TLR7 und TLR9 induzieren die Expression verschiedener Typ-I-IFNe durch das Adaptermolekül MyD88, das direkt mit IRF7 interagiert (Heim, 2012).

### IFN-Induktion durch den RIG-1-abhängigen Signalweg

Die RNA-Helikasen RIG-1 und MDA5 (Melanom-Differenzierungsantigen 5) erkennen virale RNAs und initiieren eine Signalkaskade, die zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren führt. Dies induziert die Produktion von endogenem IFN- $\alpha/\beta$ . Durch die Bindung der viralen RNA an RIG-1 und MDA5 findet bei beiden eine Konformationsänderung statt und eine Bindung mit dem Downstream-Adaptermolekül MAVS (mitochondrial anti-viral signaling protein). Dies führt zu einer Aktivierung von IRF3 (via IKK $\epsilon$ /TBK1) und NF $\kappa B$  (via IKK $\alpha/\beta$ ), die für die Transkription von Typ-I und -III-IFN-Genen erforderlich ist. Die anfängliche Ausschüttung von IFN aktiviert eine starke, positive Rückkopplungsschleife, welche eine hohe lokale IFN-Konzentration erzeugt. Sobald IFN- $\alpha/\beta$  an ihre zugehörigen Oberflächenrezeptoren binden, wird ein Signal innerhalb der Zellen über den JAK-STAT-Signalweg ausgelöst, wie in der Abbildung 1.2 beschrieben.

### 1.3.2 IFN-abhängige JAK-STAT-Signalkaskade

Die Abbildung 1.2 zeigt die IFN-Signalübertragung von allen drei IFN-Typen durch den JAK-STAT-Signalweg. Der JAK-STAT-Signalweg läuft bei den Typ-I- und Typ-III-IFNen ähnlich ab. Der Typ-I-IFN-Signalweg wird hier genauer beschrieben. Der Typ-I-IFN-Rezeptorkomplex besteht aus den IFNAR1 und IFNAR2 Untereinheiten. Jede Untereinheit bindet an spezifische Mitglieder der Janus-Kinase-Familie (JAK): IFNAR1 an die Tyrosinkinase 2 (TYK2) und IFNAR2 an JAK1. Dies löst eine Aktivierung von JAK1 und TYK2 durch Tyrosin-Transphosphorylierung aus. Die so aktivierte Kinase induziert die Bildung des IFN-stimulierbaren Genfaktor-3 (ISGF3), der sich aus zwei Elementen, ISGF3 $\alpha$  und ISGF3 $\gamma$ , zusammensetzt. ISGF3 $\alpha$  besteht aus zwei zytoplasmatischen Peptiden, STAT1 (p91) und STAT2 (p113), die eine 42%ige Nukleotidhomologie aufweisen. ISGF3 $\gamma$  ist ein Mitglied der IRF-Familie, auch IRF9 genannt. IRF9 ist meist inaktiv und befindet sich in Zytoplasma. Von dort wandert IRF9 in den Zellkern, sobald es durch IFNe aktiviert wird. Auch die STAT1-STAT2-Heterodimere werden zum Kern transportiert, um mit IRF9 zusammen den ISGF3-Komplex zu bilden. ISGF3 interagiert direkt mit dem IFN-stimulierbaren Antwortelement (ISRE), einer DNA-Sequenz, die IFN-stimulierbare Gene (ISG) charakterisiert. ISG können eine oder mehrere ISRE-Sequenzen in ihrer Promotorsequenz enthalten und werden dadurch unterschiedlich aktiviert (zusammengefasst in (Chevaliez & Pawlotsky, 2007)).

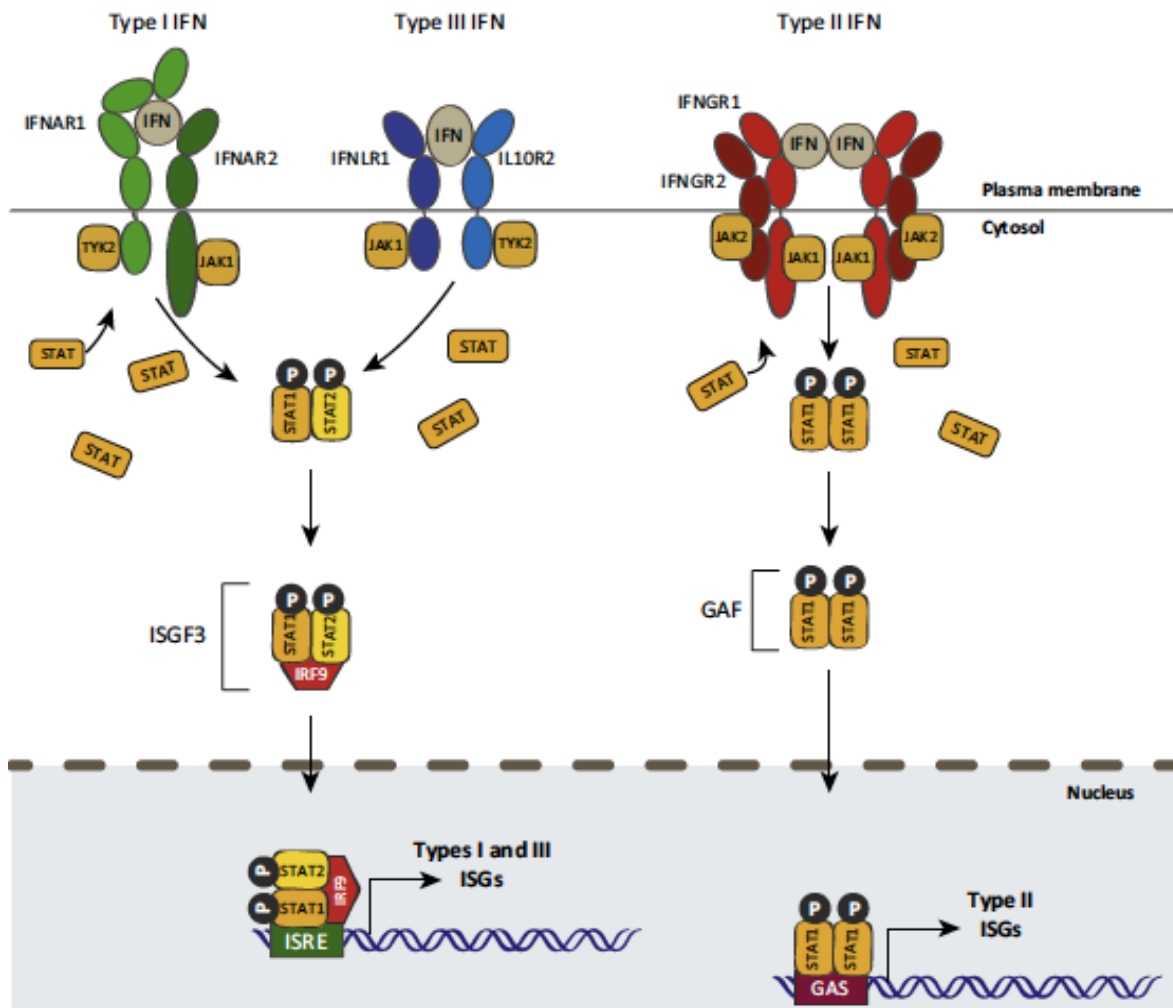


Abbildung 1.2: IFN-Signalübertragung durch den JAK-STAT-Weg. Sobald IFNe an ihre spezifischen Rezeptoren binden, werden die intrazellulären Rezeptor-assoziierten Tyrosinkinase der Janus-Kinase-Proteinfamilie aktiviert. Aktivierte JAK-Proteine phosphorylieren (P) STAT1 und STAT2. Die Heterodimerisierung der STAT-Komplexe mit IRF9 (ISGF3-Komplex) führt zur Bindung an ISRE (IFN-stimuliertes response element), was die transkriptionelle Aktivierung an den Promotoren von IFN-stimulierbaren Genen (ISG) im Nucleus auslöst. Folglich werden hunderte ISG transkriptionell reguliert. Bei der Typ-II-IFN-Aktivierung homodimerisiert phosphorylierte STAT1 zu GAF ( $\gamma$ -interferon activation factor) und bindet an GAS ( $\gamma$ -interferon activation site) (Hoffmann et al., 2015).

In den meisten Zellen aktivieren Typ-I-Interferone STAT1, STAT2 und STAT3. Für die IFN-Signalübertragung sind jedoch STAT1 und STAT2 am wichtigsten. STAT-Proteine sind zwischen 750 und 850 Aminosäuren lang. Sie unterteilen sich in gut definierte, strukturell und funktionell konservierte Domänen, wie die aminoterminalen NH<sub>2</sub>-Domäne, die DNA-bindende Domäne, die SH2-Domäne, die Linker-Domäne, die Doppelwendel-Domäne, die Tyrosin aktivierende Domäne und die Transkriptionsaktivierungsdomäne. Die SH2-Domäne spielt eine zentrale Rolle beim Andocken von STATs an Tyrosin-phosphorylierte Rezeptoren und bei der Dimerisierung von aktivierten STATs. Letztere bietet eine Spezifität der Signalübertragung durch den JAK-STAT-Signalweg (Heim, 2012). STAT1 ist ein komplexes Protein mit mehreren verschiedenen transkriptionellen Regulationsfunktionen. Das aktive STAT1 kann viele Gene zur Expression antreiben, aber auch die

Transkription anderer Gene unterdrücken (Ramana et al., 2000). Bereits die Studie von Meraz 1996 zeigte deutlich, dass Zellen und Gewebe von STAT1-defizienten Mäusen eine allgemeine Unempfindlichkeit gegenüber IFN- $\alpha$  oder IFN- $\gamma$  aufzeigen, sowohl unter gut kontrollierten *in vitro*-Bedingungen als auch unter physiologischen Bedingungen. Meraz schloss auf die unerlässliche Rolle von STAT1 sowie seine Wichtigkeit bei der Vermittlung IFN-abhängiger biologischer Prozesse, da er keinen alternativen Weg der IFN-Signalübertragung identifizieren konnte (zusammengefasst in (Ramana et al., 2000)). Basierend darauf fanden Wang und Campbell 2002 heraus, dass der Schlüsseltranskriptionsfaktor STAT1 in Neuronen von GFAP-IFN- $\alpha$  transgenen Mäusen hoch exprimiert und stark aktiviert war (Wang et al., 2002). Die Forscher zeigten, dass die neuronale Transkriptionsreaktion als Antwort auf IFN- $\alpha$  völlig STAT1-abhängig war. Das Ergebnis war sehr unerwartet, da für andere Zelltypen bereits eine STAT1-unabhängige Zellreaktion auf IFN- $\alpha/\beta$  beschrieben wurde. Daraus schlossen sie, dass Neuronen unter dem Einfluss von IFN- $\alpha/\beta$  das angeborene Potenzial besitzen, sich gegen eine Virusinfektion verteidigen zu können (Wang et al., 2005).

### 1.3.3 Eigenschaften der Typ-I-Interferone

Zusätzlich zu den bereits erwähnten direkten antiviralen und antiproliferativen Eigenschaften der Interferone besitzen diese auch potente immunmodulatorische und wachstumshemmende Eigenschaften, die zu ihrer antiviralen Wirkung durch Immuneffektorzellen beitragen. So können IFNe die Effektorfunktion von NK-Zellen, zytotoxischen T-Lymphozyten und Makrophagen stimulieren, die Expression von Molekülen des Haupthistokompatibilitätskomplexes I und II (MHC I und II), sowie die Immunglobulin-Synthese in B-Zellen induzieren und die Proliferation von T-Gedächtniszellen stimulieren. Diese Eigenschaften bieten verschiedene Möglichkeiten, die Virusreplikation durch Modulation der angeborenen und adaptiven Immunantwort zu unterbinden (Guidotti et al., 2001). Typ-I-Interferone wirken durch die Aktivierung und Reifung von dendritischen Zellen, was zu einer Hochregulation von MHCs führt. Daneben können dendritische Zellen verschiedene Chemokine, Chemokinrezeptoren und kostimulatorische Moleküle aktivieren, die wiederum eine CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort und eine T-Lymphozytenreaktion durch Unterstützung der Th1-Differenzierung modulieren (Solis et al., 2006). Neben dem antiviralen Effekt hemmen Typ-I-IFNe das Zellwachstum und steuern die Apoptose. Die antiproliferative Wirkung von IFN- $\alpha$  stellt die Grundlage für seine Verwendung bei der Behandlung des metastasierenden malignen Melanoms und des Nierenkarzinoms dar (Friedman, 2008).

### 1.3.4 Interferon-stimulierbare Gene (ISG) mit antiviralen Eigenschaften

Typ-I-IFNe entfalten ihre Wirkung vor allem durch eine JAK-STAT-vermittelte Regulation der Gentranskription. Das Ergebnis ist die Transkriptionsinduktion von ISG, welche für direkte antivirale Effektormoleküle kodieren. Diese besitzen sowohl das Potential zur positiven als auch zur

negativen Steuerung der IFN-Signalkaskade oder anderer Signale der Wirtszellen (Sarasin-Filipowicz et al., 2008). Die ersten ISG wurden vor über 25 Jahren entdeckt, aber erst in den letzten zehn Jahren fand eine genomweite Katalogisierung dieser Moleküle statt. Abhängig vom Zelltyp, der IFN-Dosis und der Behandlungszeit wurden um 500-1000 ISG in Microarray-Studien entdeckt, davon sind 200-500 Gene typisch für viele Zellen. Durch den Einblick in die Effektorfunktion von ISG-kodierten Proteinen hebt sich eine Gruppe von „klassischen ISG“, wie die Interferon-induzierbare RNA-abhängige Proteinkinase R (PKR), das Interferon-induzierte GTP-bindende Protein Mx1 (MX1) und 2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase (OAS1) hervor. PKR ist ein Inhibitor der zellulären und viralen mRNA-Translation und ist in einer Vielzahl von zellulären Prozessen, einschließlich Entzündung und Apoptose beteiligt. Mx-Proteine sind Dynamin-ähnliche GTPasen, die eine virale Replikation durch Bindung an virale Nukleokapside und an der viralen Polymerase inhibiert. Mehrere Mitglieder der OAS-Enzymfamilie werden, genauso wie PKR, durch dsRNA aktiviert. Die OASs wirken einem viralen Angriff durch den Abbau viraler RNA mithilfe von RNaseL entgegen (Haller et al., 2011). Zu den weiteren antiviralen ISG zählen auch IFITM1/2/3, ISG15, APOBEC3G, TRIM5, ADAR, ZC3HAV1 (Schoggins & Rice, 2011).

Mehrere „Knockout“-Studien und Microarray-Analysen wiesen darauf hin, dass IFN-induzierte Effektoren einen vielfältigen und überlappenden Genpool darstellen. So haben Schoggins und Kollegen 380 ISGs auf ihre Eigenschaft hin getestet, die Replikation mehrerer Viren zu hemmen. Sie testeten unter anderem die Eigenschaften des Hepatitis-C-Virus, des Gelbfieber-Virus, des West-Nil-Virus, des Chikungunya-Virus, des venezuelanischen Pferde-Enzephalitis-Virus sowie des humanen Immunschwäche Virus (HIV-1). Eine statistisch signifikante Reduktion der Virusreplikation wurde für mindestens 25 Gene demonstriert. Die Hälfte davon wurde noch nie als antiviral beschrieben. Einige ISG hatten eine breite antivirale Wirksamkeit gegen viele Viren, während andere spezifischer waren. Das „ISG-Profil“ zur Hemmung der Virusreplikation war einzigartig und teilweise überlappend mit den Profilen anderer, insbesondere derjenigen aus der gleichen Familie. In Bezug auf HCV gab es wenige Überlappungen in der Gruppe von Effektoren, die das infektiöse Virus im Vergleich zum subgenomischen Replikon vollständig hemmten (Schoggins & Rice, 2011). Einige ISG, wie ADAR, FAM46C, LY6C und MCOLN2, verbesserten sogar die Replikation von einigen Viren (Schoggins, Wilson, et al., 2011). Dabei ist die translationale Inhibition („Knockout“) bestimmter ISG ein wichtiger Angriffspunkt zur Virushemmung geworden. Während eine Vielzahl der Gene, welche die IFN-Produktion und Signalweitergabe modulieren, als Target zum Knockout ausgesucht wurde, existieren aktuell nur wenige experimentelle Daten zu Downstream-ISG Knockouts. Bei den in der Literatur beschriebenen gezielten ISG-„Knockouts“ wurde ein pathogener Phänotyp *in vivo* beobachtet, wobei die Pathogenität des Phänotyp im Vergleich zu IFNAR1<sup>-/-</sup>- oder STAT1<sup>-/-</sup>-Phänotyp mäßig ausgeprägt war. Dies ist angesichts der angenommenen Redundanz im ISG-Effektor-System nicht unerwartet. Dennoch bleibt die Tatsache,

dass diese Gene eine kritische Rolle in der Wirtsabwehr gegen eine virale Erkrankung spielen und Targets für die Entwicklung neuer antiviraler Therapiestrategien sein könnten (Schoggins, 2014).

Zu den IFN-Effektorgenen gehören nicht nur ISG, sondern eine unbekannte Klasse anderer nicht-ISG (*IFN effector genes, IEGs*), die für die antivirale Wirkung von IFN- $\alpha$  erforderlich sind. Diese werden jedoch durch IFN nicht transkriptionell induziert. Fusco und Kollegen haben 120 vorher unbekannte IEGs identifiziert. Von diesen wurden 9 vollständig evaluiert (ALG10, BCHE, DPP4, GCKR, GUCY1B3, MYST1, PPP3CB, PDIP1, SLC27A2). Diese Gene ermöglichen eine IFN- $\alpha$ -vermittelte Suppression des HCV in mehreren Stadien seines Lebenszyklus (Fusco et al., 2013). Im Gegensatz dazu spielt das Ubiquitin-verwandte Protein ISG15 (interferon stimulated gene 15, ubiquitin-like modifier) während einer HCV-Infektion eine wichtige pro-virale Rolle in der IFN-Antwort. Durch das Ausschalten der ISG15-Expression wurde eine direkte Suppression der HCV-Replikon-Replikation ausgelöst (Broering et al., 2010).

Eine besondere Eigenschaft der ISG-vermittelten, antiviralen Aktivität ist ihre Fähigkeit, mit einem einzelnen IFN-Effektor die Virusreplikation zu hemmen (Schoggins & Rice, 2011). Schoggins und Kollegen haben anhand eines Expression-Assays 47 ISG identifiziert, die einen oder mehrere Viren inhibieren, aber auch 25 Gene, die die Virusinfektiosität verbessern. Eine Vergleichsanalyse ergab, dass die untersuchten ISG (+)ssRNA-Viren stärker hemmen, als (-)ssRNA-Viren. Weiterhin hoben Gen-Clustering-Analysen den zytosolischen DNA-Sensor cGMP-AMP-Synthase (cGAS) als ein Gen hervor, dessen Expression mehrere RNA-Viren hemmt. *In vitro* löst das enzymatisch aktive cGAS ein IRF3-vermitteltes antivirales Programm aus, das unabhängig vom klassischen IFN/STAT1-Signalweg funktioniert. *In vivo*-Daten zeigten, dass cGAS ein antivirales Schlüssel-molekül in der angeborenen Immunabwehr zum Schutz des Wirtes gegen DNA- und RNA-Viren ist (Schoggins et al., 2014).

### 1.3.5 Depressionsassoziierte Interferon-Antwortgene

Typ-I-Interferone spielen eine essentielle Rolle in der wirtseigenen Abwehr gegen virale Infektionen. Diese induzieren eine Reihe von ISG, die dann die Replikation des Virus hemmen, die jedoch je nach Viruserkrankung variieren (Fusco et al., 2013; Schoggins et al., 2014; Schoggins, Wilson, et al., 2011). Einige ISG wurden bereits mit dem Auftreten von Depressionszuständen unter der IFN- $\alpha$ /Ribavirin-Therapie assoziiert (Schlaak et al., 2012). In dieser Studie von Schlaak und Kollegen wurden 15 Gene in genomweiten Transkriptomanalysen auf hochdichten DNA-Mikrochips (Affymetrix) bei 50 HCV-Patienten identifiziert, deren erhöhte Expression signifikant mit dem Auftreten depressiver Nebenwirkungen unter der IFN- $\alpha$ /Ribavirin-Therapie assoziiert war. Für sechs dieser „Depressionsgene“ (DYNLT1, GCH1, TOR1B, DISC1, MEF2A, ST3GAL5) wurden in der Literatur bereits Assoziationen mit Depression, Schizophrenie, neuronalen Entwicklungsvorgängen, sowie mit der Steuerung der Synapsenplastizität beschrieben. In einer weiteren *in vitro*-



Untersuchung von Schlaak und Kollegen wurden Blutleukozyten von Patienten mit schweren depressiven Episoden bei mono- und bipolaren Störungen mit IFN- $\alpha$ 2a stimuliert. In der anschließenden Transkriptionsanalyse wurde im Vergleich zu Gesundkontrollen eine signifikant erhöhte IFN-Sensitivität der „Depressionsgene“ nachgewiesen (Schlaak et al., 2012).

Um die Relevanz der im peripheren Blut dysregulierten „Depressionsgene“ im menschlichen Gehirn zu überprüfen, untersuchten Schlaak und Mitarbeiter in Zusammenarbeit mit dem Institut für Rechtsmedizin am Uniklinikum Essen die Basalexpression der „Depressionsgene“ in Gehirnproben von 19 Suizidopfern und 10 Nicht-Suizidopfern (u.a. Unfalltod, Mord, plötzlicher Herztod). Dazu wurden von jedem Individuum Gewebeproben aus vier Hirnregionen (Hippocampus, Amygdala, Gyrus cinguli und Pons) entnommen. Hierbei wurde bei Suizidopfern eine signifikant erhöhte Basalexpression der unten genannten 15 „Depressionsgene“ nachgewiesen (Tabelle 1.1).

Klassische ISG hingegen, wie MX1, IFIT1 und ISG15, waren in beiden Gruppen gleich exprimiert. In den verschiedenen Hirnregionen eines Individuums waren keine signifikanten Expressionsunterschiede feststellbar (Schlaak et al., 2012).

Tabelle 1.2: Validierte depressionsassoziierte, IFN-stimulierbare Gene.

Gen	Beschreibung/Funktion
CCL8	chemokine ligand 8, immune response to virus, chemotaxis
DISC1	disrupted in schizophrenia 1 / alterations of hippocampal structure and function, neurite outgrowth and cortical development, neuron migration, neuroblast proliferation
DYNLT1	dynein, light chain, Tctex-type 1 /hippocampal neuron development (e.g. neurite sprouting, axon specification, dendritic elaboration)
GBP1	guanylate binding protein 1, interferon-inducible / ISG
GCH1	GTP cyclohydrolase 1 / bipolar disorder, depression, anxiety, dopamine biosynthesis
GLRX	glutaredoxin (thioltransferase) / ISG
MEF2A	MADS box transcription enhancer factor 2, polypeptide A (myocyte enhancer factor 2A) / neuronal differentiation, suppression of hippocampal excitatory synapse number, postsynaptic differentiation
PSMB9	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 9 (large multifunctional peptidase 2) / ISG
RBCK1	RanBP-type and C3HC4-type zinc finger containing 1 / ISG
RTP4	receptor (chemosensory) transporter protein 4 / ISG
ST3GAL5	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 5 / apoptosis in mouse hippocampal cell lines; Amish infantile epilepsy syndrome; ganglioside biosynthesis
STAT1	signal transducer and activator of transcription 1 / ISG
TNFSF10	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10 / ISG
TOR1B	torsin family 1, member B (torsin B) / idiopathic dystonia, recurrent major depression; widespread neuronal expression; regulation of neurotransmitter release
UBE2L6	ubiquitin-conjugating enzyme E2L 6 / ISG

Die bisherigen Daten dieser Studie zeigen sowohl bei depressiven als auch HCV-positiven Individuen eine selektive Überexpression der depressionsassoziierten Gene in Blutleukozyten und im Gehirn. Zusätzlich wurde bei den depressiven Patienten eine Hyperresponsibilität dieser Gene in IFN-behandelten Blutleukozyten beschrieben. Die Ergebnisse könnten mit den bei HCV-Patienten häufig beobachteten kognitiven Dysfunktionen im Zusammenhang stehen, die durch eine lokale TLR-vermittelte Induktion von Typ-I-IFNen im Gehirn induziert sein könnten. Schließlich könnten diese Daten zur Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze zur Behandlung von IFN-induzierten sowie endogenen Depressionserkrankungen beitragen (Schlaak et al., 2012). Die vorliegende Arbeit stützt sich besonders auf diese Daten.

#### 1.4 Neuro-psychiatrische Symptome bei chronisch HCV-Infizierten

Bei Patienten mit chronischer HCV-Infektion wurde eine erhöhte Prävalenz der psychiatrischen Komorbidität mit dem häufigeren Auftreten von depressiven Symptome, bipolare Störung, Angst, Müdigkeit und psychotischen Symptomen beobachtet (Abbildung 1.3). Einige Hinweise deuten darauf, dass psychische Probleme mit der HCV-Infektion selbst, gegebenenfalls durch eine direkte oder indirekte Wirkung von HCV auf das zentrale Nervensystem zusammenhängen könnten, unabhängig vom Vorbestehen einer psychischen Störung (Schaefer et al., 2012).

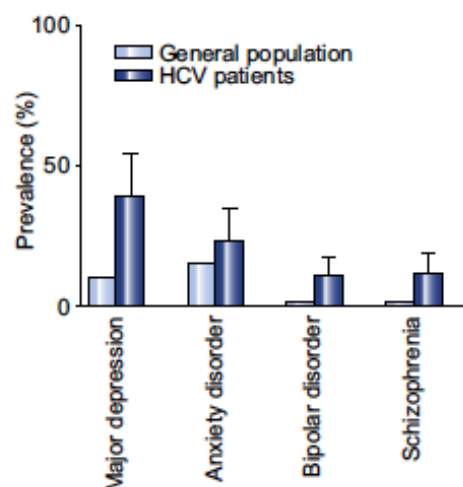


Abbildung 1.3: Erhöhte Prävalenz von psychiatrischen Nebenwirkungen bei HCV-Infizierten. Häufigkeiten von psychischen Erkrankungen in HCV-infizierten Patienten stammen aus verschiedenen Publikationen. Mittelwerte sowie Standardabweichungen wurden für jede Krankheit berechnet (abgewandelt aus Schaefer et al., 2012).

Eine Reihe von Studien unterstützen die Hypothese, dass HCV direkt oder indirekt unterschiedliche biologische Veränderungen des Metabolismus im ZNS zusammen mit einer zerebralen Immunaktivierung induziert, die zu psychiatrischen Symptomen führen könnten (Bokemeyer et al., 2011). Des Weiteren wurde eine reduzierte Dopamin-Transporter- und Serotonin-Transporter-Bindung bei HCV-infizierten Patienten berichtet, die mit einer kognitiven Dysfunktion assoziiert

war (Weissenborn et al., 2006). Darüber hinaus wurden schwere Depressionen in HCV-infizierten Patienten häufiger als bei HBV-Infizierten beobachtet, unabhängig von Drogen- oder Alkoholmissbrauch. Dies deutete auf einen spezifischen Zusammenhang zwischen einer HCV-Infektion und der Entwicklung von Depressionen hin (zusammengefasst in (Schaefer et al., 2012)).

Die Mechanismen und die Bedeutung dieser Befunde sind nicht ganz klar, aber es häufen sich virologische Daten, dass das Hepatitis-C-Virus in das ZNS eindringt und sich dort auf sehr niedrigem Niveau replizieren kann (Wilkinson et al., 2010). Das Auftreten psychiatrischer Symptome durch HCV wird anhand der beteiligten biologischen Signalwege vermutet. Allerdings konnte die Kausalität bisher noch nicht eindeutig festgestellt werden. Es sind weitere Untersuchungen notwendig, insbesondere eine Bewertung der Reversibilität mit erfolgreichen antiviralen Therapien (Schaefer et al., 2012).

Obwohl die Entwicklung von alternativen antiviralen Therapien gegen HCV mit mehreren direkt antiviral wirksamen Substanzen voranschreitet und zur Zeit als aktuelle Standardtherapie empfohlen wird, bleibt die Verabreichung von PEG-IFN- $\alpha$  in Kombination mit Ribavirin als Therapieoption zur Erst- und Re-Therapie bei allen HCV-Genotypen insbesondere in den Ländern, in denen die aktuell noch sehr teuren IFN-freien Therapien nicht finanzierbar sind (C. Sarrazin & Berg, 2015). Selbst wenn die Kombinationstherapie abhängig vom HCV-Genotyp zu hohen Erfolgsraten von 50-80 % durch das Erreichen einer SVR führt, werden psychiatrische Nebenwirkungen im Rahmen einer IFN- $\alpha$ /Ribavirin-Therapie oft unterschätzt. Während der IFN-Behandlung entwickelt sich bei 30-70% der behandelten Patienten eine Depression. Diese Häufigkeitsrate ist abhängig von der Bewertungsmethode (Diagnosegespräch, klinische Bewertung, Selbstaussage, anhand der Bewertungsskala), vom Zeitpunkt der Bewertung und von dem Schweregrad der Depression (Schaefer et al., 2012). Psychiatrische Nebenwirkungen der antiviralen Therapie schränken die therapeutischen Möglichkeiten und die Lebensqualität der Patienten während der Therapie stark ein und stellen einen der häufigsten Abbruchgründe für die Therapie dar. Zusätzlich zu Depressionen tritt eine Vielzahl anderer neuropsychiatrischer Symptome während der IFN-Behandlung auf (Tabelle 1.2).

Tabelle 1.3: Psychiatrische Nebenwirkungen von IFN- $\alpha$ .

Nebenwirkung	Häufigkeit [%]
Müdigkeit	39-80
Schlafstörungen	18-45
Verwirrtheit	16-50
Angst	11-45
Kognitive Dysfunktion	2-30
Suizidgedanken	3,5-10
Manien	0-3,2
Psychosen	0-0,6
Suizid/Suizidversuch	0-0,02

Müdigkeit stellt eine der häufigsten psychiatrischen Nebenwirkung dar, welche sich bei mehr als 80% der Patienten entwickelt. Bei bis zu 50% der Patienten können Schlafstörung, Reizbarkeit, Angst und kognitive Störungen auftreten. Im Vergleich dazu werden Manie und Psychose seltener beobachtet. Die sehr selten (<0.02 %) auftretenden Berichte von Patienten mit Suizidversuchen unter IFN-Behandlung wurden fast immer in Verbindung mit Symptomen einer organischen Wesensveränderung beschrieben, welche durch Denkstörungen, Verwirrheitszustände und Affektverflachung bis zur Affektstarre charakterisiert sind (Schaefer M. and Schwaiger M., 2003).

Die psychischen Nebenwirkungen treten auch zeitlich variabel und häufig unabhängig voneinander auf. Seltener treten sie in den ersten drei bis vier Therapiewochen auf. Leichte depressive Syndrome mit Symptomen wie reduziertem Selbstwertgefühl, vermehrter Grübelneigung und spontanem Weinen sind innerhalb der ersten drei Monate bei 30-60% der Patienten zu erwarten, während schwere Depressionen bei 20-30% der behandelten Patienten auftreten können (Schaefer M. and Schwaiger M., 2003). Miyaoka und Kollegen zeigten in ihrer Studie, dass etwa 5% der Patienten vor Beginn der IFN-Therapie bereits depressiv waren. Nach einem Monat entwickelten 21,9 %, nach 12 Wochen 38,3 % und nach 24 Wochen 27,1 % der behandelten Patienten Depressionen. Es kam zu Therapieabbrüchen wegen schweren Depressionen bei 6%, und suizidale Syndrome traten bei 3% der Patienten auf (zusammengefasst in (Schaefer, 2002)).

## 1.5 Mechanismen neuro-psychiatrischer Nebenwirkungen von IFN- $\alpha$

Auf dem Gebiet „Psychoneuroimmunologie“ wurde in den letzten Jahrzehnten viel geforscht, und es konnte ein dichtes Netz von bidirektionalen Beziehungen zwischen Immunsystem und Gehirn nachgewiesen werden. Diese gegenseitigen Wechselwirkungen haben eine große Aufmerksamkeit auf die Rolle des Immunsystems bei neuropsychiatrischen Erkrankungen, insbesondere bei schweren Depressionen gezogen (Capuron et al., 2011). Es wurden Veränderungen in der Funktion des Immunsystems bei Patienten mit schweren Depressionen festgestellt (z.B. verminderte Aktivität NK-Zellen und reduzierte Proliferation der Lymphozyten), gefolgt von Hinweisen auf erhöhte Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine wie IFN- $\alpha$ , IL1, IL6 und TNF. Diese werden sowohl von aktivierten Immunzellen während der Immunantwort auf pathogene Erreger als auch auf Verletzung oder psychosozialen Stress hin ausgeschüttet (zusammengefasst in (Capuron & Miller, 2011)). IFN- $\alpha$  ist ein das Immunsystem stimulierendes Zytokin mit antiviralen und antiproliferativen Eigenschaften und wird in einem frühen Stadium einer Virusinfektion ausgeschüttet (Kapitel 1.3.1). Zusätzlich ist IFN- $\alpha$  ein potenter Stimulator der proinflammatorischen Zytokine und Chemokine, nicht nur peripher sondern auch innerhalb des ZNS (Raison et al., 2009). Es wurde gezeigt, dass IFN- $\alpha$  wie auch andere Zytokine durch die Blut-Hirn-Schranke (BHS) bzw. Blut-Rückenmark-Schranke ins ZNS gelangen und somit direkt verschiedene Gehirnregionen beeinflussen können (Schaefer et al., 2002). Die Zytokinsignale können das Gehirn über humorale, neurona-

le und zelluläre Wege erreichen. Diese Wege umfassen fünf mögliche Mechanismen, einschließlich 1) Passage von Zytokinen durch undichte Bereiche der Blut-Hirn-Schranke, z.B. über die zirkumventrikulären Organe, wo die BHS unterbrochen ist, 2) den aktiven Transport übersättigbarer zytokinspezifischer Transportmoleküle zum Gehirndothel, 3) Aktivierung der Endothelzellen, für die nachfolgende Freisetzung sekundärer Botenstoffe (z.B. Prostaglandine und Stickstoffmonoxid (NO)) im Hirnparenchym, 4) die Übertragung von Zytokinsignalen über afferente Nervenfasern z.B. des Nervus vagus, und 5) Eintritt von peripher aktivierten Monozyten in das Hirnparenchym. Untersuchungen haben gezeigt, dass die Aktivierung dieser spezifischen Mechanismen die Zytokinwirkung unterschiedlich an das ZNS vermittelt (Capuron & Miller, 2011). Es bleibt jedoch bisher unklar, inwieweit peripher im Rahmen einer Therapie verabreichtes IFN- $\alpha$  die Blut-Hirn-Schranke unter pathologischen Bedingungen vermehrt passieren kann. So kann bei chronischer Infektion die Barrierefunktion der BHS gestört sein (Schaefer, 2002). In diesem Zusammenhang konnten messbare Mengen von IFN- $\alpha$  in humanen Liquor-Proben nach intravenöser Applikation (i.v.) einer sehr hohen IFN- $\alpha$ -Dosis (100-200 MU/Tag) und einer wiederholten i.v.-Gabe detektiert werden (Schaefer et al., 2002). In einer Studie zeigten Dafny et al. in Einzelaufnahmen verschiedener Hirnregionen (Hypothalamus, Thalamus, Hippocampus, Amygdala und somatosensorischer Kortex), dass intraperitoneal (i.p.) oder intravenös verabreichtes IFN- $\alpha$  die neuronale Aktivität nicht nur im Hypothalamus, sondern auch in kortikalen Regionen sowie in Regionen des limbischen Systems moduliert. Dies zeigte, dass sich IFN- $\alpha$  nicht nur auf die zirkumventrikulären Organe, sondern auch auf die Funktion verschiedener Hirnregionen auswirkt (Dafny et al., 1996). Neben der direkten Auswirkung von IFN- $\alpha$  kann seine Wirkung auch indirekt sein. Entweder durch eine periphere Induktion von anderen Proteinen wie Zytokinen und Wachstumsfaktoren, die in der Lage sind, die BHS zu überqueren, oder durch die Induktion von Faktoren durch Endothelzellen oder Astrozyten, die mit der BHS assoziiert sind und IFN- $\alpha$ -induzierte Zytokine in die luminale Seite sezernieren. Durch solche Mechanismen könnte IFN- $\alpha$  auch in der Lage sein, eine eigene Synthese in den Zellen des ZNS, beispielsweise in Astrozyten, zu induzieren (Schaefer et al., 2002).

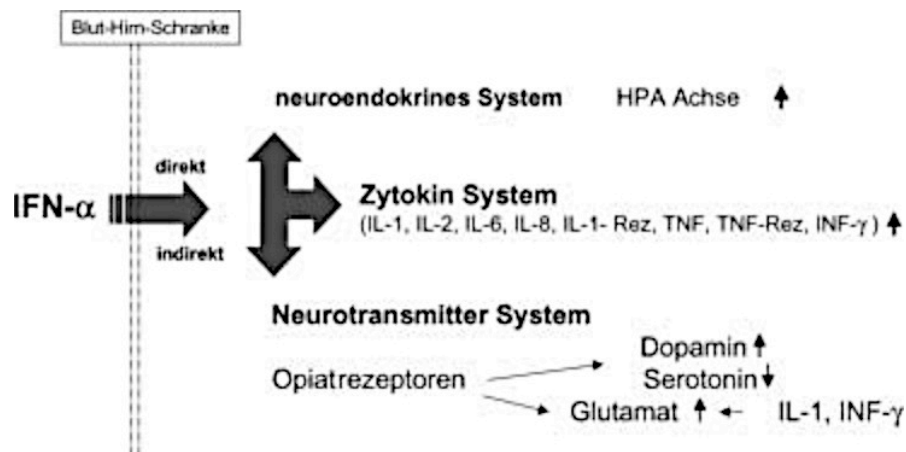


Abbildung 1.4: Übersicht der möglichen Mechanismen IFN- $\alpha$ -induzierter psychiatrischer Störungen. Interferon kann direkt oder indirekt über eine Stimulation proinflammatorischer Zytokine und über die Modifikation von Serotonin, Noradrenalin, Glutamat und die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HHN) (hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis) Depressionen verursachen (aus (Schaefer M. and Schwaiger M., 2003)).

#### Einfluss von IFN- $\alpha$ auf proinflammatorische Zytokine

IFN- $\alpha$  hat einen großen Einfluss auf verschiedene immunologische Parameter, Zytokine, Zytokin-Rezeptoren und Chemokine. IFN- $\alpha$  induziert IL1, IL2, IL6, IL8, IFN- $\gamma$ , TNF und ihre Zytokinrezeptoren (Abbildung 1.4). Auf der anderen Seite hemmt IFN- $\alpha$  die Produktion von IL1 $\alpha$ , IL5 und des IL6-Rezeptors (Schaefer et al., 2002). Deshalb sind Zytokine und ihre zentrale Rolle als Mediatoren für psychiatrische Erkrankungen durch neuropsychimmunologische Mechanismen derzeit in der Diskussion. Auch an der Genese von Depressionen scheinen proinflammatorische Zytokine direkt oder indirekt beteiligt zu sein (Maes, 1999). Da unter antidepressiver Behandlung die Produktion proinflammatorischer Zytokine inhibiert wird, könnten das Auswirkungen auf die Therapie IFN- $\alpha$ -assoziiierter Depressionen haben. IL1 und IFN- $\gamma$  werden durch IFN- $\alpha$  besonders stark aktiviert. Sie sind zentrale Modulatoren der Neurotransmitter Serotonin und Glutamat und spielen eine Rolle in der Pathogenese verschiedener neuropsychiatrischer Störungen (zusammengefasst in (Schaefer et al., 2002)). Wilkinson et al. und Loftis et al. haben gezeigt, dass die Menge an proinflammatorischen Zytokinen/Chemokinen wie IL1 $\alpha/\beta$ , IL8, IL12, IL16, IL18, IL28, CXCL10/IP-10 und TNF im post-mortem Hirngewebe von HCV-Individuen und im Blut von HCV-Patienten mit depressiven Symptomen erhöht war (Loftis et al., 2008; Wilkinson et al., 2010). Während der HCV-Infektion reagiert das Immunsystem mit einer angeborenen Immunantwort, die sich durch eine starke Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und Chemokine auszeichnet. Ein Grund dafür ist die Erkennung der HCV-dsRNA durch den Toll-like Rezeptor 3 (TLR3). Dadurch wird eine Kaskade an proinflammatorischen Zytokinen ausgelöst (Finberg et al., 2004). Lafon et al. haben gezeigt, dass menschliche Neuronen den TLR3-Rezeptor exprimieren und nach der Stimulation mit dem TLR3-Agonisten Polyinosin:Polycytidylsäure Poly(I:C) die proinflammatorischen Zytokine IL6 und TNF sowie die Chemokine CCL5 und CXCL10 stark exprimieren (Lafon et al., 2006). Der durch TLR3 ausgelöste Signalweg führt unter anderem zur Produktion von endogenem

IFN- $\alpha$  und zur erhöhten Expression von ISG (Wang et al., 2008). Eine starke neuronale TLR-3 Expression im humanen Gehirn wurde auch in anderen pathologischen Zuständen, wie der Alzheimer-Krankheit beobachtet, was darauf hindeutet, dass Entzündungen – ein allgemeiner Faktor dieser Erkrankungen – die TLR3-Expression in humanen Neuronen verstärkt (Lafon et al., 2006). Auch in einer Studie von Schlaak und Kollegen wurde gezeigt, dass die Serumkonzentration von proinflammatorischen Zytokinen, wie IL1, IL6, TNF, IFN- $\gamma$  und CXCL10/IP-10 durch die Gabe von IFN- $\alpha$ , ähnlich wie in Serumproben von depressiven Patienten, stark ansteigt (Schlaak et al., 2012). Zytokine können aufgrund ihrer zentraltoxischen Wirkungen Konzentrations- und Gedächtnisstörungen oder hirnnorganische Veränderungen zur Folge haben (Schaefer, 2002). Somit wird die Hypothese von psychiatrischen Nebenwirkungen mit immunologischen Veränderungen während der IFN- $\alpha$ -Behandlung bestärkt und nach möglichen Mechanismen für diese Veränderungen geforscht. Es wurden verschiedene Mechanismen als Ursache psychiatrischer Nebenwirkungen von IFN- $\alpha$  bereits angenommen. Das Hauptaugenmerk liegt auf zwei wichtigen ätiologischen Wegen, die sich jeweils an den Veränderungen im Monoaminstoffwechsel, d.h. an einer Modulation zentraler Neurotransmitter wie Serotonin, Glutamat und Dopamin, und an der Beeinträchtigung neuroendokriner Funktionen durch Stimulation der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HHN-Achse) beteiligen (Abbildung 1.4).

#### Einfluss IFN- $\alpha$ auf Neurotransmitter

Als wichtigster Mechanismus für die psychischen Nebenwirkungen von IFN- $\alpha$  werden Einflüsse auf verschiedene Neurotransmitter, einschließlich Serotonin, Dopamin, Glutamat, Noradrenalin und die direkte zytotoxische Zytokinwirkung diskutiert (Schaefer M. and Schwaiger M., 2003; Schaefer et al., 2012)). Experimentelle Studien zeigten, dass IFN- $\alpha$  in der Lage ist, die Synthese, das Transportsystem und den Umsatz von Monoaminen zu verändern. Zumeist kann IFN- $\alpha$  agonistisch an Opiatrezeptoren wirken, da es strukturelle Ähnlichkeiten mit endogenen Opiaten hat. Durch diese opiatartigen Wirkungen, wie Analgesie und Katatonie, können Interferone zentrale serotonerge, dopaminerge und glutamaterge Veränderungen bewirken (zusammengefasst in (Schaefer, 2002)). Zunächst wurden allgemeine Veränderungen der neuronalen Aktivität beobachtet, indem IFN- $\alpha$  die Spontanaktivität in neuronalen hippocampalen Zellen und Neuronen des somatosensorischen Kortex erhöht hat. In der funktionellen Bildgebung konnte ein frontaler Hypometabolismus bei niedrig dosierter subkutaner Interferongabe festgestellt werden, der mit der Schwere der depressiven Symptomatik korreliert (zusammengefasst in (Schaefer M. and Schwaiger M., 2003)).

Als wesentliche Ursache der Entstehung von Depressionen unter der Behandlung mit IFN- $\alpha$  wird die veränderte Aktivität des Enzyms Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) im Serotoninstoffwechsel und eine erhöhte Expression von Serotonintransportern gesehen. Untersuchungen zeigten eine star-

ke Überproduktion des Enzyms IDO nach einer IFN- $\alpha$  Gabe (Schaefer et al., 2003). Fujigaki und Kollegen fanden heraus, dass das Enzym IDO neben IFN- $\alpha$  auch durch proinflammatorische Zytokine, IFN- $\gamma$  und TNF, alleine oder in Kombination beeinflusst werden kann (Fujigaki et al., 2006). Aktiviertes IDO wandelt Tryptophan, welches eine Vorstufe von Serotonin ist, zu N-Formylkynurenin (KYN) um. Es wird vermutet, dass die Abnahme der Tryptophankonzentration für die Serotoninsynthese im ZNS relevant ist (zusammengefasst in (Schaefer et al., 2012)). Auch die Überproduktion von IDO, sowie die Stimulation der Transkription des Serotonintransporters führt zu niedrigen Plasmakonzentrationen von Tryptophan und somit auch von Serotonin im Gehirn, was zur Entstehung einer IFN- $\alpha$ -induzierten Depression beitragen könnte (Loftis et al., 2010; Schaefer et al., 2002). Wichers und Kollegen fanden heraus, dass nicht nur der Tryptophanmangel, sondern auch die Überproduktion von KYN Auswirkungen auf die Neurotransmitterfunktion und das psychomotorische Verhalten haben (Wichers et al., 2005), da die KYN-Applikation alleine ein depressions-ähnliches Verhalten bei Mäusen hervorgerufen hat (zusammengefasst in (Schaefer et al., 2012)). Zusätzlich wurde die Synthesekapazität von Dopamin (DA) und Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>, ein Enzym-Cofaktor von Phenylalanin, Tyrosin- und Tryptophan-Hydrolasen) nach der IFN- $\alpha$ -Gabe in verschiedenen Hirnregionen von Ratten beeinträchtigt. BH<sub>4</sub> ist ein wichtiger Cofaktor und das geschwindigkeitsbestimmende Enzym in der Dopamin-Synthese, welcher Tyrosin zu L-Dopa umwandelt. BH<sub>4</sub> wird auch für die Synthese von Neurotransmittern, wie Serotonin, 5-Hydroxytryptophan, Adrenalin, Noradrenalin benötigt. Deshalb ist dieser Cofaktor für neurologische Funktionen essentiell (zusammengefasst in (Schaefer et al., 2012)). Einflüsse durch IFN auf BH<sub>4</sub> haben vermutlich einen gemeinsamen Mechanismus durch den die Dopamin-Verfügbarkeit in entsprechenden Hirnregionen reduziert wird (zusammengefasst in (Capuron & Miller, 2011)).

IFN- $\alpha$  beeinflusst nicht nur die Abnahme der Serotonin- und Dopamin-Biosynthese, sondern induziert zusätzlich eine erhöhte Aktivität von Serotonin- und Dopamintransportern durch den zytokin-vermittelten MAP-Kinase-Signalweg (*mitogen-activated protein, MAP*). Die synaptische Konzentration der entsprechenden Neurotransmitter wird dadurch stark erniedrigt. Die Modulation durch IFN- $\alpha$  in der Dopamin-Expression wird ebenfalls als eine der möglichen Ursachen psychotischer Symptome betrachtet (zusammengefasst in (Capuron & Miller, 2011)).

Zusammenfassend kann IFN- $\alpha$  direkt oder indirekt über eine Stimulation proinflammatorischer Zytokine in die Modifikation des Monoaminstoffwechsels eingreifen und neuropsychiatrische Nebenwirkungen und Depressionen verursachen.

#### Einfluss von IFN- $\alpha$ auf neuroendokrine Funktion

Ein anderer Mechanismus als Ursache für neuropsychiatrische Nebenwirkungen durch IFN- $\alpha$  umfasst Veränderungen der neuroendokrinen Funktionen. Veränderungen in der Funktion der Hypo-



thalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HHN-Achse) sind Hauptkennzeichen für neuropsychiatrische Störungen – besonders bei schweren Depressionen (Capuron & Miller, 2011).

Die HHN-Achse ist ein Stresshormonsystem, welches durch den Hypothalamus gesteuert wird und das Kortikotropin-Releasing-Hormon (CRH) produziert. Das CRH regt die Ausschüttung des Adrenokortikotropen Hormons (ACTH) an, das wiederum die Bildung von Glukokortikoiden (z.B. Cortisol) in der Nebennierenrinde stimuliert. Cortisol spielt eine wichtige Rolle im Glukosestoffwechsel und in der Unterbindung der Feedback-Wirkung zur CRH-Bildung. Eine IFN-induzierte Aktivierung der HHN-Achse findet durch eine direkte Stimulation des CRH und des Arginin-Vasopressins statt, die die Produktion von Cortisol erhöhen. Claes berichtete, dass die CRH- und ACTH-Konzentrationen in depressiv erkrankten Patienten stark erhöht sind. Eine erhöhte Konzentration dieser Peptide und des Stresshormons Cortisol scheint direkt für angst- und depressionsauslösende Zustände verantwortlich zu sein (Claes, 2004). Eine erhöhte HHN-Reaktivität wurde während der akuten IFN- $\alpha$ -Verabreichung beobachtet und mit der Entwicklung einer schweren Depression in späten Stadien der IFN-Behandlung verbunden (Schaefer, 2002). IFN ist auch in der Lage, die ACTH und Cortisol-Antwort auf exogenes CRH zu verstärken. Bei einer chronischen IFN-Verabreichung konnte hingegen keine kontinuierliche Aktivierung der HHN-Achse gefunden werden (Capuron et al., 2003). Diese Ergebnisse deuten auf eine adaptive Veränderung der HHN-Achse während der chronischen IFN-Verabreichung hin. Der Mechanismus könnte mit der Hemmung des Kortikosteroid-Rezeptor-Signals durch inflammatorische Zytokine zusammenhängen, während diese die Translokation des Glukokortikoid-Rezeptors (GR) aus dem Zytoplasma in den Zellkern, sowie seine weitere Funktion beeinträchtigen (Pace et al., 2009). Auch Zytokine können die GR-Expression beeinflussen, was zu einer verminderten GR-alpha-Expression (aktive Form des Rezeptors) und einer erhöhten GR-beta-Expression (eine schwach aktive GR-Isoform) führt. Angesichts der fundamentalen Rolle der endogenen Glukokortikoide (Cortisol) bei der Hemmung von Entzündungsreaktionen, können Zytokin-induzierte Veränderungen in der Funktion der HHN-Achse und eine verringerte GR-Funktion Entzündungen erheblich verstärken (Capuron & Miller, 2011). Auch neuroendokrine Anomalien, wie Hypercortisolismus, wurden mit Stimmungsschwankungen in Verbindung gebracht (Schaefer et al., 2002). Gemäß Raison und Kollegen bewirken CRH und Cortisol eine Dysregulation in der Produktion von sekundären Zytokinen (IL1, IL2, IL6 und TNF), was den Serotonin-, Norepinephrin- und Dopaminspiegel aus dem Gleichgewicht bringt (Raison et al., 2006). Eine Überempfindlichkeit des neuroendokrinen Systems auf sekundäre Zytokine könnte mit der Entwicklung einer IFN- $\alpha$ -induzierten Depression eng verbunden sein (Abbildung 1.4).

## 1.6 RNA-Interferenz (RNAi)

RNA-Interferenz (RNAi) ist ein evolutionär hoch konservierter Mechanismus, der einerseits der Abwehr eindringender Fremd-RNA (z.B. bei einer Virusinfektion) dient, und andererseits eine Methode zur Genregulation darstellt. Die Entdeckung des Mechanismus 1990 zunächst in Petunien, dann 1998 im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* führte zu dieser Bezeichnung. Bei der RNAi handelt sich um Überlagerungsprozesse auf molekularer Ebene, d.h. eine Degradation zellulärer mRNA durch Einschleusen einer 21-23 Nukleotide kurzen, artifiziellen, doppelsträngigen RNA-Sequenz (short/small interfering RNA, siRNA). Das betroffene Gen wird somit „stummgeschaltet“, obwohl es noch transkribiert wird. Dieser Vorgang ist auch als „Gen-Silencing“, „Co-Suppression“, „Down“-Regulation, „Knockdown“ oder auch als posttranskriptionelles „Gen-Silencing“ bekannt (Schmitz, 2011). Die eingesetzte siRNA muss homolog zu einer spezifischen Ziel-mRNA in der Zelle sein, um die RNA-abhängige Abschaltung des Zielgens auszulösen.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die siRNA in die Zelle zu bringen: Eine besteht darin, die siRNA mit Hilfe eines Expressionsvektors in Zellen einzuschleusen (stabile RNA-Interferenz). Der Vektor enthält eine DNA-Sequenz, die für die doppelsträngigen, haarnadelförmigen RNA-Sequenzen (short hairpin, shRNA) codiert, welche nach Prozessierung im Zytoplasma als kurze siRNA (21-23 Nukleotide) wirken. Die andere Variante besteht darin, synthetische siRNA einzusetzen (transiente RNA-Interferenz). Diese siRNA wird in die Zelle eingeschleust (Transfektion). Das verbreitetste Verfahren hierzu ist die Transfektion mit kationischen Lipiden - die Lipofektion. Die Lipide bilden im wässrigen Milieu Mizellen oder Liposomen, mit denen die siRNA zu Lipoplexten komplexiert. Diese werden endozytotisch in die Zelle aufgenommen, um nach dem Zerfall des Endosoms ins Zytoplasma freigesetzt zu werden. Hier verbindet sich die siRNA mit dem RNase-II-Enzym Dicer und verschiedenen zellulären Proteinen zu einem Enzymkomplex, dem RISC-Komplex (RNA-induced silencing complex) (Abbildung 1.5). Erst nach der Entwindung der doppelsträngigen siRNA wird der RISC aktiviert. Dieser trennt die beiden Stränge der siRNA und ermöglicht das Andocken des komplementären siRNA-Einzelstranges an die zelluläre Ziel-mRNA-Sequenz. Der zweite Einzelstrang spielt dagegen für das „Gen-Silencing“ keine Rolle. Die Nukleasen des RISC-Komplexes degradieren die Ziel-mRNA. Somit wird die Expression des Ziel-Gens posttranskriptionell inhibiert, was bedeutet, dass eine Hemmung der Proteinsynthese stattfindet (Schmitz, 2011).

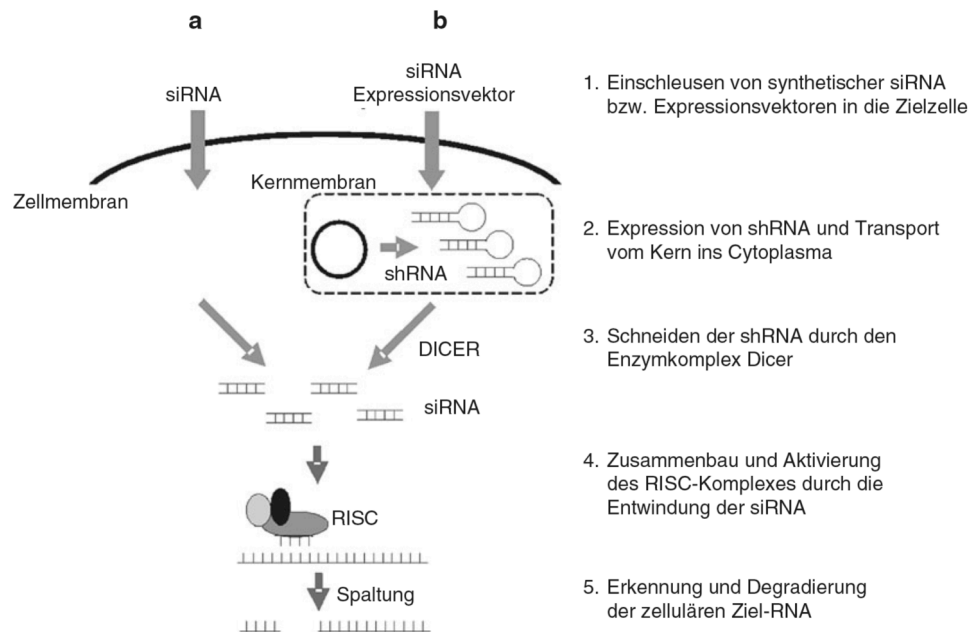


Abbildung 1.5: Schema der RNAi-vermittelten Genregulation. RNAi wird entweder durch das direkte Einbringen von (a) synthetisch hergestellten kurzen RNA-Oligonukleotiden (siRNA) oder (b) durch die Expression von kurzen Haarnadel-RNAs (short hairpin, shRNA) eingeleitet. Die Expression von shRNA erfolgt durch Expressionsvektoren im Zellkern. Nach deren Transport in das Zytoplasma werden sie vom Nuklease-Komplex Dicer in siRNAs (21-23 Nukleotide) geschnitten. Die siRNAs werden entwunden und an den Multienzymkomplex RISC gebunden. Die siRNA vermittelt dann die sequenzspezifische Bindung des RISC-Komplexes an die Ziel-RNA und leitet deren Degradierung ein (Schmitz, 2011).

Die „Down“-Regulation von Zielgenen ist in Säugerzellen nicht einfach. Es können unspezifische Effekte, sogenannte „Off-Target“-Effekte auftreten. Sie können den mRNA-Abbau, die Inhibition der Translation oder die Induktion einer Interferonantwort verursachen (Jackson et al., 2003; Sledz et al., 2003). Einer dieser Effekte tritt auf, wenn die siRNA nicht auf die spezifische Ziel-mRNA trifft (*mismatch*), d.h., die siRNA beeinflusst die Expression von heterologen oder teil-homologen Zielgenen. Zusätzlich kann die exogene Aufnahme von doppelsträngiger dsRNA mit mehr als 30 Nukleotiden zu einer „Interferon-Antwort“ führen. Das bedeutet, dass diese unspezifische, zelluläre Antwort als Abwehrmechanismus gegen Viren, die dsRNA enthalten, aktiviert wird. Schließlich führt die induzierte Interferon-Antwort zu einer Stimulation der Apoptose. Dieser unerwünschte Nebeneffekt kann jedoch durch das Einschleusen oder die Expression von siRNAs mit weniger als 30 Nukleotiden umgangen werden. Die Ursachen für die unspezifischen Effekte sind noch nicht vollständig verstanden. Einige der Faktoren könnte das siRNA-Design und mögliche Homologien zu anderen Sequenzen sein. Weitere Untersuchungen zeigten, dass Nebeneffekte, die zu irreführenden Ergebnissen im RNAi-Experiment führen, weitgehend durch Verwendung von niedrigen siRNA-Konzentrationen *in vitro* und *in vivo* vermieden werden können (Persengiev et al., 2004). Ein weiterer „Off-Target“-Effekt könnte durch Aufnahme des Sense-Strangs in den RISC-Komplex verursacht werden. Dies kann durch chemische Modifikation der siRNA am 5'-Ende des Sense-Strangs durch LNA (*locked nucleic acid*) vermindert werden. Es kommt zur signifikanten Erhö-

hung der Bindungsenergie des jeweiligen Nukleotids. Ein LNA-modifizierter siRNA-Strang beeinflusst zudem die Aktivität von RISC negativ, was zu einer Verringerung eines unspezifischen Abbaus von mRNA durch eine ungewollte Aufnahme des falschen Strangs führt. Eine weitere Strategie umfasst den Einsatz von Duplex-siRNA. Dabei sind beide Stränge gegen die komplementäre Ziel-mRNA gerichtet. Die Duplex-siRNA ist palindromisch oder partiell komplementär aufgebaut. Sie verfügt über die charakteristischen 3'-überhängende Enden und weist eine den siRNAs ähnliche Stabilität auf. Jeder Strang einer Duplex-siRNA kann für ein anderes Zielgen kodiert sein, so können mit dieser Methode zwei verschiedene Gene parallel ausgeschaltet werden. Die Effizienz der siRNA kann durch chemische Modifikationen, den Einschluss in und Transfer durch Liposomen, sowie durch parallele Injektion mit Transfektionsreagenzien verbessert werden (Thurisch, 2007).

Die siRNA-vermittelte Downregulation der Proteinexpression durch synthetische oder vektorcodierte siRNA stellt eine der meist genutzten *in vitro*- und *in vivo*-Techniken dar. Diese Methode hat nicht nur in der Grundlagenforschung ein großes Potential, sondern gewinnt auch im therapeutischen Bereich zunehmend an Bedeutung. In dieser Arbeit wird auf die Verwendung von synthetischen siRNAs in den *in vitro*-Experimenten fokussiert.

## 1.7 Neuroanatomie der Depression und *in vitro*-Techniken neuronalen Zellkultur

Eine Vielzahl von neuropsychiatrischen Störungen, Depression inbegriffen, entstehen im Gehirn. Depression wird dabei mit der Überaktivierung bestimmter Teile des limbischen Systems (emotionales Zentrum) und zu einer Unteraktivierung kortikaler Regionen des Frontalhirns (kognitives Zentrum) verbunden. Die Störung der Reizleitung zwischen fronto-limbischen und subkortikalen Regionen scheint die für die schweren Episoden typischen Stimmungsveränderungen hervorzurufen (Lee et al., 2008). Dafür besonders anfällige Hirnregionen sind unter anderem der präfrontale Kortex (Sibille et al., 2004) und der Hippocampus (Warner-Schmidt et al., 2006). Der Hippocampus ist eine der zentralen Strukturen für Lern- und Gedächtnisprozesse, Zustandekommen von Aggression, Affektverhalten, Bewusstsein, Motivation und Kognition. In ihm fließen viele Informationen zusammen, die anschließend zum Kortex zurück gesendet werden. Der präfrontale Kortex ist eine der wichtigsten Strukturen, die für das emotionale Bewusstsein, Kognition und für das Gedächtnis verantwortlich sind. Diese Hirnareale wurden in der strukturellen Bildgebung des Gehirns ausgiebig untersucht, um Strukturen und zugehörige Schaltungen sowie strukturellen Auffälligkeiten in der Depression herzustellen. Eine Volumenreduktion der grauen Substanz zusammen mit Veränderungen der neurophysiologischen Aktivität dieser Bereiche wurden mit der Pathophysiologie der Major Depression (*major depressive disorder, MDD*) in Verbindung gebracht (Vassilopoulou et al., 2013). Um diese Hirnregionen für verschiedene Fragestellungen genauer *in*

*vitro* zu untersuchen, verwendet man eine der häufigsten *in vitro*-Techniken – eine Zellkultur aus Gehirnzellen dieser Hirnregionen. Die *in vitro*-Zellkultur ermöglicht eine leichte Zugänglichkeit zu den bestimmten Zellen, die in chemisch definierten Medien kultiviert werden. Durch *in vitro*-Kultivierung können einzelne Zelltypen genauer kontrolliert werden, wodurch ihre Genexpressionsprofile unter verschiedenen Bedingungen gezielter analysiert werden können. Man unterscheidet zwischen einer permanenten und primären Zellkultur. Bei der Ersten handelt es sich um immortalisierte Zellen, die ein unbegrenztes Teilungspotenzial besitzen. Sie sind leichter zu kultivieren als Primärkultur, sind gut charakterisiert und ständig verfügbar. In Folge ihrer „Unsterblichkeit“ verändern sie aber ihre Wachstumseigenschaften, wie die Wachstumsrate oder Morphologie (transformierter Phänotyp). Trotz vieler Vorteile beim Arbeiten mit einer permanenten Zelllinie, ist ein entscheidender Nachteil, dass sie nur noch wenige ihrer ursprünglichen *in vivo*-Charakteristika besitzen (Schmitz, 2011). Bei Primärkultur handelt es sich hingegen um Zellen, die aus Organen oder Gewebe verschiedener Spenderorganismen isoliert werden. Die Lebensdauer der Primärkultur ist unter *in vitro*-Bedingungen limitiert, wodurch eigenen sie sich nicht für zeitlich ausgedehnte Studien eignen. Sie lassen sich methodisch leicht isolieren und behalten *in vitro* gewöhnlich die meisten Eigenschaften und Charakteristika bei, durch die sie *in vivo* gekennzeichnet sind. Ein besonderer Vorteil der Primärzellen ist, dass sie sich in ihrem Genexpressionsprofil von transformierten Zellen unterscheiden. Daher werden sie für Genanalysen auf der Expressionsebene bevorzugt herangezogen.

Die wichtigsten Hauptzelltypen im Gehirn sind Nervenzellen (Neuronen) und Gliazellen. Neuronen bestehen aus einem Zellkörper und mehreren Fortsätzen: Einem Axon und mehreren Dendriten. Darüber werden Informationen empfangen und ausgesendet. Sie sind am bekanntesten und wohl auch der wichtigste Zelltyp im Gehirn. Die *in vitro*-Kultivierung von Neuronen ist seit ca. 20 Jahren etabliert und wird vielfach genutzt. Für die Untersuchungen in dieser Dissertation wären primäre humane Gehirn-Neuronen wünschenswert, da diese aber nicht verfügbar sind, wird eine primäre neuronale Zellkultur einer Maus des Inzuchtstammes C57BL/6 verwendet. Aufgrund seiner Verfügbarkeit, leichter Zucht und Robustheit wird er oft als Modell für die Erforschung menschlicher Krankheiten verwendet. Zur Herstellung einer Primärkultur werden oft embryonale (E) und frühe postnatale neuronale Gewebe genutzt. Für die *in vitro*-Kultivierung von Neuronen wählt man in der Regel eher embryonale Stadien, da postnatale, stark differenzierte Neuronen die Präparationsschritte nicht überstehen. Für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden primäre murine hippocampale und kortikale Neuronen aus Gehirnen der Mausembryonen (E 17-18) beiden Geschlechts nach einer modifizierten Methode von Kaech und Banker präpariert und kultiviert (Kaech et al., 2006). Durch die Verwendung der *in vitro*-Techniken der neuronalen Primärkultur wird eine Brücke zwischen artifiziellen Systemen und dem *in vivo*-Tierversuch dargestellt.

## 2 Ziele

IFN- $\alpha$  verursacht eine hohe Depressionsrate bei Patienten, die sich gegen Hepatitis C behandeln ließen. Es wurden im großen Umfang IFN- $\alpha$ -vermittelte Depressionen beobachtet, die suizidales Verhalten hervorrufen könnten. Die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen sind allerdings nicht ganz klar. In einer Studie von Schlaak et al. wurden bei 50 HCV-Patienten in genomweiten Transkriptomanalysen 15 Gene (ISG, „Depressionsgene“, depressionsassoziierte Gene) identifiziert, deren selektive Überexpression und Hyperresponsibilität sowie von Typ-I- und Typ-II-IFNen in Blutleukozyten und im Gehirn, sowohl von depressiven als auch von HCV-positiven Individuen mit dem Auftreten depressiver Nebenwirkungen unter IFN- $\alpha$ /Ribavirin-Therapie assoziiert sind. Die gleichen „Depressionsgene“ wurden auch in post-mortem Gehirnen von suizidalen Personen als hochreguliert vorgefunden (C. Hoyo-Becerra, Huebener, A., et al., 2013; Schlaak et al., 2012). Die meisten dieser Gene wurden in der Literatur bereits mit Depression, Schizophrenie, neuronalen Entwicklungsvorgängen und mit der Steuerung der Synapsenplastizität assoziiert. Basierend auf den bisherigen Daten sollen in dieser Dissertation neue Erkenntnisse über die Bedeutung die Rolle dieser depressionsassoziierten Gene im Gehirn für die Pathophysiologie der IFN-induzierten sowie der endogenen Depressionserkrankungen gewonnen werden. Schließlich könnten sie zur Entdeckung neuer therapeutischer Ansätze zur Behandlung der oben genannten Erkrankungen führen.

Dazu sollte im ersten Teil der Arbeit eine primäres Zellkultursystem aus embryonalen Mausneuronen (Hippocampus, präfrontaler Kortex) entwickelt werden. Die IFN-Therapiebedingungen sollten mithilfe von mIFN und Poly(I:C) simuliert und die Induzierbarkeit der 15 validierten „Depressionsgene“ sollte dabei charakterisiert werden. Unter diesen Bedingungen sollen die Expressionslevel von proinflammatorischen Zytokinen auf molekularbiologischen und proteinbiochemischen Ebenen sowie die Induzierbarkeit von relevanten Neurotransmittermolekülen des Serotonin-/Dopaminsystems im Fokus bleiben.

Unter dem Aspekt der Induzierbarkeit der „Depressionsgene“ in der neuronalen Primärzellkultur wird im Weiteren mithilfe der RNAi-basierten Technologie die Bedeutung dieser Gene für die Entwicklung einer IFN-vermittelten, endogenen/exogenen Depression *in vitro* charakterisiert. Dabei soll der „Gen-Silencing“-Effekt auf die Expression anderer „Depressionsgene“ selbst sowie auf das Expressionsniveau der proinflammatorischen Zytokine und Neurotransmittermoleküle nachgewiesen werden. Das Ausschalten von depressionsassoziierten Genen mittels RNAi-Technologie im Gehirn eines Patienten bietet einen viel versprechenden Angriffspunkt für einen neuen Therapieansatz.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

Tabelle 3.1: Diverse Materialien

BIOCOAT <sup>®</sup> Poly-L-Lysin, 24 well-Platte	BD Biocoat, Heidelberg
BLAUBRAND <sup>®</sup> -Zählkammer	Brandt GmbH+Co KG, Wertheim
Cellstar <sup>®</sup> 6 well-, 12 well-, 24 well-Platten	Greiner bio-one, Frickenhausen
Cellstar <sup>®</sup> Zellkulturflaschen T-25	Greiner bio-one, Frickenhausen
Deckgläser $\varnothing$ 12 mm	Karl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe
Diverse sterile Pipetten 1 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	BD Falcon, Heidelberg
Diverse Dissektionsinstrumente	B Braun Melsungen AG, Berlin
Frischhaltefolie Saran	Dow, Schalbach/Ts.
Kryogefäße 2 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen
Mini-Protean <sup>®</sup> TGX <sup>™</sup> Gels 20 $\mu$ l/well	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
NuPAGE 4-12 % Bis-Tris Gel, 1,5 mm*10 well	Invitrogen, Karlsruhe
Nalgene "Mr. Frosty" Einfriercontainer für 1-2 mL Kryogefäße	Thermo Scientific, Schwerte
Objektträger 76x26 mm	Karl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe
Parafilm MS	Pechiney Plastic Packaging, USA
Turbo Transfert Pack Midi format 4-15 %, 0,2 $\mu$ m PVDF	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Pasteurpipetten aus Glas 230 mm	Brand GmbH+CoKG, Wertheim
PCR Sealers <sup>™</sup> Microseal <sup>®</sup> 'B' Film	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Hard-Shell <sup>®</sup> PCR Plates 96 well WHT/CLR	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
PCR-Reaktionsgefäße	nerbe plus GmbH, Winsen
Petrischalen (35x10 mm; 100x20 mm)	BD Falcon, Heidelberg
Plastikküvetten UVette <sup>®</sup>	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1 ml, 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Sterile Einweg-Skalpelle	Mediware <sup>®</sup> , Wesel
Sterile Kanüle 21Gx1 <sup>1/2</sup> cc, 20Gx1 <sup>1/2</sup> cc	BD Microlance <sup>™</sup> , Heidelberg
Sterile Spritze 1 ml, 2 ml 10 ml ohne Kanüle	Terumo GmbH, Eschborn
TipOne <sup>®</sup> RPT Ladespitzen	StarLab GmbH, Ahrensburg
Whatman Papier Dicke 3 mm CHR	Schleicher & Schuell BioScience, Dassel
Zellsieb , Nylonsieb 40 $\mu$ m	BD Falcon, Heidelberg
Zellschaber S 240 mm	TPP <sup>®</sup> , Schweiz
Hypercassette <sup>™</sup> 18x24 cm	Amersham Bioscience, UK
Zentrifugationsröhrchen 50 ml, 15 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen

## 3.1.1 Geräte

Tabelle 3.2: Verwendete Geräte

Analysewaage DeltaRange <sup>®</sup> AT261	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Analysewaage MP-3000 Chyo	Göntgen Wägetechnik, Bottrop
Autoklav VX-150	Systex GmbH, Nürnberg
Geldokumentationssystem E-BOX VX2	PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen
Binokular Motic <sup>®</sup> Microscopes	Oehmen Labortechnik, Essen
BioPhotometer	Eppendorf, Hambrung
Bio-Rad Power Pac HC Power Supply	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
C1000Touch <sup>™</sup> Thermal Cycler CFX96 <sup>™</sup>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Eismaschine AF100	Scotsman <sup>®</sup> Ice Systems, USA
Evos XL core Mikroskop	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Fusion FX7	Vilber Lourmat, Eberhardzell
Schüttler Vibramax100	Heidolph, Schwabach
Heracells <sup>®</sup> CO <sub>2</sub> Inkubator	Thermo Scientific GmbH, Schwerte
Inverses Durchlichtmikroskop TM5	Nikon, Düsseldorf
Kühlzentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge 5415R, Tischzentrifuge 5424	
Spektralphotometer Lambda E	MWG Biotech GmbH, Ebersberg
Mini-Protean <sup>®</sup> Tetra Cell Elektrophorese Apparatur	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Multipette <sup>®</sup> stream	Eppendorf, Hamburg
Milli-Q <sup>®</sup> Reference System	Millipore
Nikon Eclipse TS100 Inverses PS Mikroskop	Nikon, Düsseldorf
pH-Meter 765 Calimatic	Knick, Berlin
Pipettierhilfe	Pipetus Akku, Hirschmann Laborgeräte
Pipetten (research, pipetman, Finnpietette <sup>®</sup> )	Eppendorf, Gilson, Thermo scientific
Rotor-Gene 2000 Real Time Cycler	Corbett Research, Mortlake, Australia
Schüttler Rocky <sup>®</sup> 3D	Oehmen Labortechnik, Esssen
Shaker L-40	Oehmen Labortechnik, Esssen
Sicherheitswerkbank NU-437Class II	Oehmen Labortechnik, Esssen
Sicherheitswerkbank safe 2020	Thermo Scientific, Schwerte
Trans-Blot <sup>®</sup> Turbo <sup>™</sup> Transfer Starter System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Vortexer Reax Top	Heidolph, Schwabach
Vortexer RS-VA10	Phoenix Instrument
Wasserbad	GFL - Gesellschaft für Labortechnik mbH
Wasserbad TW12	Julabo, Seelbach



## 3.1.2 Kits

Tabelle 3.3: Verwendete Versuchssysteme

RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden
QuantiFast SYBR Green RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden
Proteome Profiler™, Mouse Cytokine Array Panel A, Antibody Array Kit	R&D Systems, Wiesbaden
Venor® GeM, Mycoplasma Detection Kit	Minerva Biolabs, Berlin
Bio-Rad DC Protein Assay Kit	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
RNase-free DNase Set	Qiagen, Hilden
Quick Cell Proliferation Assay Kit (500)	Abcam®, UK
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden

## 3.1.3 Oligonukleotide

Tabelle 3.4: Verwendete Oligonukleotide

Name	Katalognummer
mo_βAct_forward 5'-aaatcgtgcgtgacatcaaa-3'	Primer-Wunschsynthese, Eurofins MWG Ope- ron
mo_βAct_reverse 5'-caagaaggaaggctggaaaa-3'	
mo_Ifit1_forward 5'-ctgaaatgccaagtagcaagg-3'	
mo_Ifit1_reverse 5'-ccaaaggcacagacataagga-3'	
mo_Mx2_forward 5'-aacttcattgctgggtaggt-3'	
mo_Mx2_reverse 5'-ttgatctggcgtcctatgtct-3'	
QuantiTect Primer Assay (Qiagen):	
Dynlt1b	QT00249312
Tor1b	QT01067535
Disc1	QT01079008
Mef2a	QT00137480
Gch1	QT01063111
St3gal5	QT00127792
Psmb9	QT00174349
GlrX	QT00110607
Rbck1	QT00150577
Stat1	QT01149519
Rtp4	QT00134470
Ube2L6	QT01038359
Gbp1	QT01063111
Tnfsf10	QT02424058

<i>Ccl2</i>	QT00167832
<i>Ccl3</i>	QT00248199
<i>Ccl4</i>	QT00154616
<i>Ccl5</i>	QT01747165
<i>Ccl8</i>	QT00128548
<i>Cxcl1</i>	QT00115647
<i>Cxcl2</i>	QT00113253
<i>Cxcl10/Ip10</i>	QT00093436
<i>Il6</i>	QT00098875
<i>Ifng</i>	QT01038821
<i>Tnf</i>	QT00104006
<i>Ido1</i>	QT00103936
<i>Slc6a3</i>	QT02488220
<i>Slc6a4</i>	QT00163345
<i>Htr1a</i>	QT02488213
FlexiTube siRNA (Qiagen):	
Mm_Stat1_1	SI00183547
CCAATGCTCTATCAAACCTATA	Entrez Gene ID 20846 Predesigned siRNA directed against mouse Stat1; Detected transcripts: NM_001205313, NM_001205314, NM_009283
Mm/Hs_MAPK1 control siRNA (5 nmol)	1022564
AATGCTGACTCCAAAGCTCTG	Detected transcripts: NM_001038663, NM_002745, NM_011949, NM_138957
AllStars Negative Control siRNA (5 nmol) (annealed, double-stranded siRNA, thoroughly tested and validated nonsilencing siRNA)	1027280

### 3.1.4 Chemische Substanzen und Puffer

Tabelle 3.5: Substanzen und Puffer

10xRIPA Puffer	Cell Signaling Technology, Frankfurt/M.
10xTBE-Puffer	Gibco, Life Technologies, Karlsruhe
10xTris/Glycin/SDS 4-15 % Puffer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
10xTBS Puffer	24,23 g Trizma HCl 80,6 g NaCl 800 ml ddH <sub>2</sub> O, pH 7,6, auf 1 l auffüllen
1xTBS Puffer	100 ml 10xTBS 900 ml ddH <sub>2</sub> O, pH 7,6 0,1% Tween <sup>®</sup> 20 BioXtra
30xDTT 1ml	Cell Signaling Technology, Frankfurt/M.
1xTE Puffer, pH 8,0	Ambion, Darmstadt

3xRed Loading Buffer Pack	Cell Signaling Technology, Frankfurt/M.
6xOrange DNA Loading Dye	Fermentas. St. Leon-Rot
Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare, München
BrdU Labeling Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
BSA Fraktion V, pH 7.0	PAA Laboratories, Österreich
Blockierungslösung für Western Blot	5 % Magermilchpulver in 1xTBST
cOmplete Mini EDTA-free Protease inhibitor cocktail tablets	Roche, Mannheim
Desoxyribonuklease I (2000 Kunitz units/vial)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethanol ca. 96 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethidiumbromidlösung 0,025 %	Karl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe
EDTA	Karl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe
Fluoromount-G™	eBioscience, Frankfurt/M.
Glycin	Merck, Darmstadt
Halt™ Phosphatase Inhibitor cocktail 100x, 1 ml	Thermo Scientific, Schwerte
Hoechst 33342, 10 mg/ml	Invitrogen, Karlsruhe
HiPerFect® Transfection Reagent	Qiagen, Hilden
Interferon $\alpha$ A, Maus, rekombinant	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Isofluran Forene 100 %	Abbott, Wiesbaden
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Lane marker sample Buffer (5x)	Thermo Scientific, Schwerte
Magermilchpulver	AppliChem, Darmstadt
Natriumchlorid	Gerbu, Botechnik GmbH
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
NuPage Sample Loading Buffer (4x)	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE Transfer Buffer (20x)	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE, MES SDS Running Buffer (20x)	Invitrogen, Karlsruhe
Öl für Fluoreszenzmikroskopie, Immersol™ 518F	Zeiss, Jena
Poly(I:C) high molecular weight	InvivoGen, Frankreich
Poly-L-lysine hydrobromide	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Paraformaldehyd 30 %	Karl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe
Ponseau S	Invitrogen, Karlsruhe
Proteinase K, 10 ml, >600 mAU/ml	Qiagen, Hilden
QIAzol® Lysis Reagenz	Qiagen, Hilden
RNaseA 100 mg/ml	Qiagen, Hilden
SDS, Natriumdodecylsulfat	Merck, Darmstadt
TopVersion™ Low Melting Point Agarose	Fermentas, St. Leon-Rot
Tris-HCl	Karl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe
Triton X100 500 ml	Sigma Aldrich, Taufkirchen

Tween <sup>®</sup> 20 BioXtra	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypanblau-Lösung 0,4 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

### 3.1.5 Größenstandards

Tabelle 3.6: Verwendete Größenstandards

GeneRuler <sup>TM</sup> 1 kb DNA Ladder 0,1 µg/µl	Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler <sup>TM</sup> 100 bp DNA Ladder 0,1 µg/µl	Fermentas, St. Leon-Rot
MagicMark <sup>TM</sup> XP Standard	Invitrogen, Karlsruhe
Page Ruler Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot

### 3.1.6 Zellkulturmedien und Reagenzien

Tabelle 3.7: Medien und Reagenzien für Zellkultur

DMEM-Medium, 4,5 g/l Glukose, mit L-Glutamin	PAA Laboratories, Österreich
B27 Supplement (50x)	Gibco <sup>®</sup> , Life Technologies, Karlsruhe
Neurobasal <sup>TM</sup> Medium (1x)	Gibco <sup>®</sup> , Life Technologies, Karlsruhe
Fetales Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories, Österreich
L-Glutamin 200 mM	PAA Laboratories, Österreich
1xHBSS Puffer	PAA Laboratories, Österreich
1xDPBS (w/o Ca, Mg)	Gibco, Life Technologies, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA Laboratories, Österreich
Poly-L-lysine-hydrobromide mol wt 30,000-70,000	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Trypsin-EDTA (1x)	PAA Laboratories, Österreich

### 3.1.7 Zellkulturlinie

In dieser Arbeit wurde mit Zellkulturlinie HT22 gearbeitet, einer hippocampalen Mausneuronenzelllinie, als großzügiges Geschenk von Frau PD. Dr. rer. nat. Yuan Zhu, Neurochirurgisches Forschungslabor, Klinik für Neurochirurgie, Universitätsklinikum Essen. Die neuronale Spezifität der Zelllinie wurde mit dem spezifischen Primer  $\beta$ III-Tubulin und mithilfe der quantitativer Reverse-Transkriptase PCR mit „real-time“-Detektion (qRT-PCR) (s. Abschnitt 3.4.2) ermittelt.

### 3.1.8 Versuchstiere

Sieben bis neun Wochen alte weibliche C57BL/6 Mäuse, sowie ihre Mausembryonen (E 17-18, beiden Geschlechts) wurden vom Zentralen Tierlaboratorium, Universitätsklinikum Essen bezogen. Die Mäuse am Universitätsklinikum Essen wurden unter tierärztlicher Kontrolle gezüchtet. Die tierexperimentellen Arbeiten für diese Dissertation wurden vom LANUV NRW unter der Projektnummer G 1229/11 genehmigt unter Einhaltung der Bestimmungen der Deutschen Tierschutzverordnung durchgeführt.

## 3.2 Methoden der Zellkultur

Im folgenden Kapitel werden Techniken der Zellkultivierung von hippocampalen Mausneuronen der Zelllinie HT22 und zur Zellisolation von primären neuronalen Zellen aus dem Hirngewebe der Mausembryonen Stamm C57BL/6 sowie deren Kultivierung beschrieben.

### 3.2.1 Kultivierung der Zelllinie HT22

Dabei werden die  $4.5 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> in einer T75-Kulturflasche im DMEM-Medium mit entsprechenden Zusätzen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt bis zur 80-90 %igen Konfluenz kultiviert. Das Medium wird alle zwei Tage gewechselt.

Kultivierungsmedium:      DMEM-Medium (Glukose 4,5 g/l, mit L-Glutamin)  
                                     10 % fetales Kälberserum  
                                     0,2 % Penicillin/Streptomycin (100x)

### 3.2.2 Passagieren der Zellen

Passagieren von Zellen erfolgt bei 80%iger Konfluenz. Das Medium wird abgesaugt und die Zellen werden zweimal mit 5 ml DPBS gewaschen. Zum Ablösen der Primärkulturzellen wird eine 0,05 % Trypsin-EDTA Lösung für 2-3 min bei 37 °C verwendet. Durch die Zugabe von frischem, serumhaltigem Kulturmedium wird die enzymatische Reaktion gestoppt. Die Zellsuspension wird bei 1500 upm 7 min bei 4 °C abzentrifugiert. Das gebildete Zellpellet wird in frischem Medium aufgenommen und anschließend dessen Zellzahl bestimmt.

### 3.2.3 Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung

Zur Vitalitätsbestimmung werden die Zellen mit Trypanblaulösung 0,4 % im Verhältnis 1:2 gemischt und mindestens 1 min inkubiert. Hier wird die Permeabilität der Zellmembran als Vitalitätsparameter untersucht. Im Gegensatz zu den geschädigten Zellen nehmen die lebensfähigen Zellen Trypanblau nicht auf und erscheinen daher unter dem Mikroskop ungefärbt. Der Farbstoff dringt in geschädigte Zellen ein und färbt deren Zytoplasma blau an. Mithilfe einer Neubauer-Zählkammer werden vitale Zellen gezählt. Es werden vier große Eckquadrate ausgezählt und deren Mittelwert ermittelt. Jedes große Quadrat der Zählkammer hat ein Volumen von 0,1 mm<sup>3</sup> bzw. 10<sup>-4</sup> cm<sup>3</sup>. Da 1 cm<sup>3</sup> einem Milliliter entspricht, kann die entsprechende Zellkonzentration pro ml nach folgender Gleichung bestimmt werden:

$$\frac{\text{Zellsumme aus 4 Quadraten} \times 2 (\text{Verdünnungsfaktor}) \times 10^4}{4 (\text{Anzahl der Quadrate})} = \text{Zellzahl/ml}$$

### 3.2.4 Einfrieren und Auftauen der Zelllinie HT22

In einer T75-Zellkulturflasche werden  $10^6$  Zellen bis 90 % Konfluenz inkubiert. Nach der Zugabe von 5 ml Trypsin-Lösung und 5 min Inkubationszeit wird die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 5 ml Medium gestoppt. Die geernteten Zellen werden bei 3000 upm für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wird mit weiteren 5 ml Medium gewaschen und die Vitalitäts- sowie Zellzahl im Verhältnis 1:5 der Trypanblau 0,4 % Lösung bestimmt. Die Zellzahl wird durch  $10^6$  dividiert, um das Kryomedium-Volumen in Millilitern zu bestimmen. Das bei -20 °C gelagerte Kryomedium wird im entsprechenden Volumen hinzugefügt und das Zellpellet darin gelöst. Die Kryogefäße werden in einem Nalgene® Einfrierkontainer mit Isopropanol bei -80 °C für 2 h gelagert und anschließend in einen flüssigen Stickstofftank überführt.

Kryomedium: 10 % DMSO  
90 % Fetales Kälberserum

Zum Auftauen der Zelllinie werden die Kryogefäße mit  $10^6$  Zellen aus dem Stickstofftank entnommen und im Wasserbad bei 37 °C kurz aufgetaut. Die Zellsuspension wird unverzüglich in 10 ml vorgewärmtem DMEM-Medium aufgenommen und bei 1500 upm, 7 min lang bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt, und somit das enthaltene DMSO aus der Zellsuspension entfernt. Danach wird das Zellpellet in frischem Medium (1 ml) aufgenommen und in zwei T75-Flaschen mit vorbereitetem DMEM-Medium (9 ml) überführt. Die Zellkultur wird bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> bis zur 80%igen Konfluenz inkubiert.

### 3.2.5 Isolierung von primären Neuronen aus dem Hippocampus und dem präfrontalen Kortex

Für die Kultivierung von primären Neuronen verwendet man Mausembryonen von C57BL/6-Mäusen am Embryonaltag 17-18 (E 17-18). Dazu werden trächtigen Mäuse in einer Glasglocke mit Isofluran-gesättigter Atmosphäre narkotisiert, indem ein isoflurangetränkter Wattebausch mindestens fünf Minuten in die Glasglocke verbracht wird. Anschließend wird so anästhesierte Maus durch zervikale Dislokation getötet. Das Abdomen des toten Muttertiers wird mit 70%igem Ethanol gereinigt und die Embryos werden vorsichtig aus dem Uterus der Maus entnommen, das Amnion entfernt und in einer Petrischale mit kaltem 1xHBSS auf Eis überführt. Die Köpfe werden durch einen schnellen geraden Schnitt vom Körper getrennt und in eine saubere Petrischale mit kaltem 1xHBSS überführt. Die Schädeldecken öffnet man mit zwei Pinzetten, um die Hemisphären zu isolieren. Unter dem Binokular werden die Regionen des präfrontalen Kortexes und des Hippocampus isoliert und in einem 15 ml Gefäß mit eiskaltem 1xHBSS auf Eis gesammelt. Der Gewebeverdau der Isolate erfolgt nach drei Waschschritten mit 1xHBSS in einer Lösung mit 1 % Trypsin-EDTA und DNase I (nur für präfrontalen Kortex) 15 min lang bei 37 °C. Nach dem Verdau wird

das Gewebe im warmen DMEM-Medium aufgenommen und mehrmals darin gewaschen. Das Homogenisieren des verdauten Gewebes erfolgt durch das mehrmalige Auf- und Abpipettieren mit einer Pipettenspitze, möglichst ohne Blasen zu erzeugen. Die Zellsuspension wird durch ein 40 µm Nylonsieb gefiltert, um diese von unverdauten Gewebestücken zu befreien. Nach der anschließenden Zellzahlbestimmung mit der Zählkammer werden die Zellen für unterschiedliche Experimente ausgesät und im DMEM-Medium bis zum nächsten Tag kultiviert. Danach erfolgt ein Mediumwechsel gegen ein Differenzierungsmedium.

Sammellösung: 1xHBSS ohne  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$

Gewebeverdauungslösung: 9 ml 1xHBSS  
1 ml Trypsin-EDTA (1x)  
100 µl DNase I (Endkonzentration 20 IU/ml)

Kulturmedium: DMEM-Medium (Glukose 4,5 g/l, mit L-Glutamin)  
10 % fetaler Kälberserum  
1 % Penicillin/Streptomycin

Differenzierungsmedium: Neurobasal<sup>®</sup> Medium (1x)  
2 % B27 Supplement (50x)  
1 % L-Glutamin 200 mM  
1 % Penicillin/Streptomycin (100x)

### 3.2.6 Kultivierung von primären hippocampalen und kortikalen Neuronen

Hippocampale und kortikale Zellen werden in einer Dichte von  $6 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> auf einer mit Poly-L-Lysin (PLL) beschichteten Wachstumsfläche ausgesät und 24 h im DMEM-Medium bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Poly-L-Lysin ist ein kationisches, biodegradierbares, synthetisches Polymer. Die Oberflächenbehandlung mit PLL verbessert die adhäsiven Eigenschaften durch Veränderung der Oberflächenladung von negativ zu positiv. Somit werden die Zellen konstitutiv zur unspezifischen Adhäsion gebracht.

Nach 24 h erfolgt ein Mediumwechsel zum Neurobasal<sup>®</sup> Medium mit entsprechenden Zusätzen, welches ein Differenzierungsmedium speziell für pränatale und embryonale hippocampalen Neuronen ist. Es ist ebenso für das optimale Wachstum und Überleben von Neuronen aus dem embryonalen Kortex ohne zusätzlichen Astrozyten-Feeder-Layer geeignet (G. J. Brewer, 1995). Das Medium wird alle vier Tage zur Hälfte gegen frisches Medium gewechselt. Um die Neuronen zur reinen Neuronenkultur ausdifferenzieren zu lassen, werden sie erst am Tag 8 (8 DIV) zum *in vitro*-

Experiment hinzugezogen. Die Langzeitkultivierung ist notwendig, da erst am Tag 5 *in vitro* die Anzahl an Gliazellen reduziert wird (Gregory J. Brewer, 1997). Die Reinheit der Neuronenkultur wurde routinemäßig in einer immunozytochemischen Untersuchung überprüft und betrug am Tag 8 *in vitro* >80%.

### 3.3 *In vitro*-Experimente

#### 3.3.1 Stimulation von HT22 Zellen mit mIFN- $\alpha$

Zellen der HT22 Zelllinie werden 20 h nach entsprechenden Kulturbedingungen inkubiert (Kapitel 3.2.1). Nach 20 h der Inkubationszeit werden die Zellen für 24 h mit dem rekombinanten Protein IFN- $\alpha$ A aus der Maus in diversen Konzentrationen (IU/ml) stimuliert. Die Auswahl der Konzentration von IFN- $\alpha$ A und des Zeitpunktes beruht auf eigenen etablierten Ergebnissen der Konzentration-Zeit-Kurve. Nach der Stimulation werden die Zellen abgeerntet und molekularbiologisch untersucht.

#### 3.3.2 *In vitro*-Stimulation von primären hippocampalen und kortikalen Neuronen

Nach der Gewinnung der primären Neuronen (Kapitel 3.2.5) werden die Neuronen  $6 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup>, 8 DIV, aus dem Hippocampus und dem präfrontalen Kortex sowohl mit rekombinanten IFN- $\alpha$ A aus der Maus in der Konzentration 1000 IU/ml als auch mit Poly(I:C) 100  $\mu$ g/ml und der Kombination aus beiden für 24 h stimuliert. Die Auswahl der Konzentrationen und des Zeitpunktes beruht auf eigenen etablierten Ergebnissen der Konzentration-Zeit-Kurve. Das Zellmaterial wird nach 24 h Inkubationszeit bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> gesammelt und für weitere Experimente genutzt.



## 3.4 Molekularbiologische Methoden

### 3.4.1 RNA-Isolation aus Zellen

Die RNA-Extraktionsmethode beruht auf der RNeasy<sup>®</sup> Spinsäulen-Technologie und stellt eine effektive Methode der RNA-Aufreinigung mithilfe der Silica-Membrantechnologie dar (Schade et al., 2007). Die genauen Schritte der Extraktion werden nach den Herstellerangaben des RNeasy Mini Kits (Qiagen) und eines DNase-Verdau durchgeführt.

Nach dem Absaugen des Mediums werden adhärent wachsende Zellen in 1 ml Qiazol Lysisreagenz (Qiagen) aufgenommen. Der Lysepuffer enthält Guanidium-Isothiocyanat und  $\beta$ -Mercaptoethanol, was die Probe unter stark denaturierenden Bedingungen lysiert und RNasen inaktiviert. Die Lyse erfolgt bei Raumtemperatur, 5 min lang durch Zugabe von 200  $\mu$ l Chloroform und dient zur Auftrennung der Phasen. Nach dem 15minütigen Zentrifugationsschritt bei 4 °C wird die obere wässrige, die RNA enthaltende Phase vorsichtig abgenommen (ca. 600  $\mu$ l). Nach Zugabe von 600  $\mu$ l 70%igen Ethanol wird die RNA gefällt und anschließend an die Silicamembran gebunden. Durch zwei weitere Waschschrte mit dem RW1-Puffer (RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit, Qiagen) wird die Membran von Reagenzresten gereinigt. Eine mögliche DNA-Kontamination wird durch einen DNase I-Verdau (15 min, Raumtemperatur) verhindert (RNase-free DNase Set, Qiagen). Nach einem weiteren Waschschrte der Spinsäule mit dem RPE-Puffer (RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit, Qiagen) wird die dort gebundene RNA mit RNase-freiem Wasser von der Silicamembran eluiert. Das Elutionsvolumen der Gesamt-RNA beträgt 40  $\mu$ l. Die Quantifizierung und Reinheit der RNA werden photometrisch durch die Bildung des Quotienten  $OD_{260nm}/OD_{280nm}$  bestimmt. Hochreine Total-RNA weist Quotienten von 1,9-2,0 auf. Bis zum Einsatz in der quantitativen Real-Time-RT-PCR werden die Proben bei -80 °C gelagert.

### 3.4.2 Quantitative Real-Time-RT-PCR

Die quantitative Real-Time-PCR ist eine *in vitro*-Amplifikationsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion beruht jedoch dabei eine Quantifizierung der amplifizierten DNA bietet (Holzapfel, 2007). Die Quantifizierung der Zielsequenz erfolgt während jedes PCR-Zyklus in Echtzeit (engl.: real time) mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green I, der in die neu synthetisierte doppelsträngige DNA interkaliert. Bei dieser Methode werden konventionelle unmarkierte Primer (Qiagen und Eurofins MWG Operon) verwendet, denn der Farbstoff lagert sich an dem neu synthetisierten DNA-Abschnitt ein. Bei der relativen Quantifizierungsmethode wurde das „housekeeping“-Gen,  $\beta$ -Aktin (Actb), der Maus (Eurofins MWG Operon) als internes Referenzgen verwendet, um damit den Einfluss graduell unterschiedlicher Gewebemengen in den einzelnen Reaktionsansätzen herausrechnen zu können. Hierbei wurde die mRNA-Kopienzahl zur Anzahl der Actb-Transkripte ins Verhältnis gesetzt.

Die quantitative RT-PCR (reverse Transkriptase-PCR) von Gentranskripten wird mittels Ein-Schritt-RT-PCR (one-step RT-PCR) am C1000Touch™ Thermal Cycler CFX96™ (Bio-Rad Laboratories GmbH) und dem QuantiFast SYBR Green RT-PCR Kit (Qiagen) im 96-Well-Format durchgeführt.

Tabelle 3.8: Pipettierschema des Real-Time RT-PCR-Ansatzes

7,5 µl QuantiFast SYBR Green RT-PCR Master Mix (2x)
1,5 µl forward Primer (5 µM)
1,5 µl reverse Primer (5 µM)
2,4 µl RNase-freies Wasser
0,14 µl QuantiFast RT-Mix
2 µl Proben-RNA (≤ 10 ng)

Die PCR-Ansätze werden in die Platten (Hard-Shell® PCR Plates 96 well WHT/CLR) pipettiert und mit einer Klebefolie (PCR Sealers™ Microseal® 'B' Film) luftdicht verschlossen, 1 min lang bei 650 upm und 4 °C anzentrifugiert und in den C1000Touch™ Thermal Cycler CFX96™ überführt.

Tabelle 3.9: Zyklusbedingungen für quantitative Real-Time RT-PCR

Analysemodus	Verlauf	Temperatur	Zeit	Fluoreszenzmessung
Reverse Transkription		50°C	10 min	keine
Amplifikation 40x:		95°C	5 min	keine
	Denaturierung	95°C	10 s	keine
	Annealing/Extension	60°C	30 s	einfach
Schmelzkurvenanalyse 60x:				
	Annealing	65°C	31 s	keine
	Schmelzvorgang	+0,5°C/cycle bis 95°C	5 s	kontinuierlich
Kühlung/Lagerung		4°C	∞	keine

Das Kit enthält einen optimierten Reverse-Transkriptase-Mix für eine effiziente und schnelle cDNA-Synthese vor dem ersten Zyklus. Zu Beginn der PCR ist die cDNA-Menge des Gens begrenzt (Startphase). Durch die Amplifikation nimmt die DNA-Menge exponentiell zu, bis die PCR durch den Verbrauch der Substrate (Oligos, Nukleotiden, Mg) und die „Ermüdung“ der Taq-Polymerase gehemmt wird (Plateauphase). Während der exponentiellen Phase nimmt die Fluoreszenz proportional zur Menge des gebildeten Produktes zu. Die Quantifizierung erfolgt in der exponentiellen Phase. Die Kopienzahl kann durch den C<sub>q</sub>-Wert bestimmt werden. Als C<sub>q</sub>-Wert wird der

Zyklus angegeben, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt (Holzapfel, 2007). Die Kalkulation der Genexpression erfolgt durch die Normierung des amplifizierten Gens gegen das „housekeeping“-Gen, Actb. Die verwendeten Primer sind in der Tabelle 3.4 aufgelistet.

### 3.4.3 siRNA-vermittelte Genregulation *in vitro*

Die siRNA Technologie basiert auf dem RNA-Interferenz Prinzip. Dabei wird eine doppelsträngige RNA zu einer spezifischen Ziel-mRNA eingesetzt und somit die sequenzspezifische Expression von komplementären Genen herunterreguliert.

In dem Experiment werden synthetisch hergestellte RNA-Doppelstränge von 21-23 Nukleotiden, sog. siRNA („short interfering“ oder „small interfering“), der Firma Qiagen verwendet. Die siRNA wird mittels Transfektionsreagenz HiPerFect (Qiagen) in die Zelle eingeschleust. HiPerFect ist eine einzigartige Mischung aus kationischen und neutralen Lipiden, die eine wirksame siRNA-Aufnahme und effiziente Freisetzung der siRNA in die Zelle ermöglicht. Die siRNA verbindet sich mit Dicer, einer Endoribonuklease, die doppelsträngige RNA in kurze, doppelsträngige Fragmente schneidet, und anderen zellulären Proteinen zum Multienzymkomplex RISC (RNA-induced silencing complex), der durch die Entwindung der doppelsträngigen siRNA aktiviert wird. Die doppelsträngige siRNA wird innerhalb des Komplexes getrennt und in Einzelstränge überführt. Einer der siRNA-Einzelstränge spielt eine Rolle bei der Herunterregulierung durch komplementäre Paarung an der zellulären mRNA-Sequenz (Schmitz, 2011). Die Degradierung der Ziel-RNA erfolgt durch die Nukleaseaktivität des RISC-Komplexes. Somit wird die Proteinsynthese effektiv gehemmt, jedoch nicht die Transkription.

Die siRNA-vermittelte Gensuppression und ihre Effizienz werden in der hippocampalen und präfrontalen Primärzellkultur in diversen Versuchsansätzen optimiert (Tabelle 3.10). Die hippocampalen und kortikalen Zellen wurden nach 8 DIV mit siRNA (FlexiTube siRNA, Qiagen) transfiziert (Tabelle 3.4). FlexiTube siRNA ist eine vordefinierte, gegen ein bestimmtes Gen gerichtete siRNA. Durch das innovative Design wird das Risiko von off-target-Effekten minimiert und es ist eine kosteneffektive Lösung für RNAi Analyse einer kleinen Anzahl von Genen.

Tabelle 3.10: Optimierte Transfektionsbedingungen für siRNA-vermittelte Genregulation

	Hippocampus		Präfrontaler Kortex	
siRNA- Bezeichnung	siRNA- Konzentration [nM]	Transfektions- zeit [h]	siRNA- Konzentration [nM]	Transfektions- zeit [h]
Mm_Stat1_1	50	24	100	24

Das genaue Pipettierschema von siRNA und Transfektionsreagenz wurden dem Protokoll des Herstellers (Fast-Forward Transfection QIAGEN Supplementary Protocol, Qiagen) entnommen. Hippocampale und kortikale Zellen wurden ( $2 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup>) auf einer mit Poly-L-Lysin beschichteten 96-well-Platten ausgesät und 8 Tage unter Standardbedingungen in 150 µl/well Neurobasalmedium inkubiert (Kapitel 3.2.6). Die Forward-Transfektion wurde mit der empfohlenen Menge an siRNA (12,5 ng) begonnen. Die siRNA wurde erst in 50 µl serumfreien Neurobasalmedium gelöst. Als Kontrolle wurde die gleiche Menge einer nicht-codogenen siRNA (AllStars Negativ Control siRNA, Qiagen) eingesetzt. Zur Bestätigung eines positiven Kontroll-„Knockdowns“ wurde eine „Mm/Hs\_MAPK1 positive control siRNA“, (Qiagen) in der gleichen Konzentration bei den Optimierungsversuchen verwendet (Tabelle 3.4). Des Weiteren wurde zu jedem Ansatz 0,75 µl vom Transfektionsreagenz HiPerFect (Qiagen) hinzugefügt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Je 50 µl des Transfektionskomplexes wurde tropfenweise zu jeder Vertiefung in der Platte zugegeben, so dass das Endvolumen von 200 µl entsprach. Die Zellen wurden anschließend unter Standardbedingungen 24 h inkubiert. Die „Knockdown“-Effizienz und die Gensuppression des Zielgens wurde mit kommerziellen Primern mittels quantitativer RT-PCR validiert (Tabelle 3.4). Die optimierten Transfektionsbedingungen für siStat1 sind in der Tabelle 3.10 dargestellt.

### 3.5 Proteinbiochemische Methoden

#### 3.5.1 Gewinnung von Proteinproben

Um eine ausreichende Proteinausbeute zu bekommen, werden primäre Neuronen zu  $2,4 \times 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup> auf einer mit PLL beschichteten 24-well-Platte ausgesät und experimentell behandelt. Am Tag der Zellernte (8 DIV) wird das Medium gründlich abgesaugt und die Zellkulturplatte direkt auf Eis gestellt. In jede Vertiefung pipettiert man den kalten RIPA-Puffer mit entsprechenden Protease- und Phosphataseinhibitoren und lässt die Zellen 5 min auf Eis lysieren. Mithilfe einer umgedrehten Pipettenspitze werden adhärent wachsende Zellen von der Oberfläche abgekratzt und in vorbereitete kalte Röhrchen überführt. Den Zelldebris trennt man in einem Zentrifugationsschritt 6 min lang, bei 4000 upm ab. Das Zelllysate wird bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

### 3.5.2 Proteinbestimmung mittels BCA-Tests

Zur Quantifizierung des Proteingehalts der Proben *in vitro* wird eine Proteinbestimmung mittels des Bio Rad D<sub>C</sub> Protein Assays durchgeführt. Das Prinzip der Bestimmung basiert auf einer modifizierten Lowry Methode. Es ist eine zweistufige Reaktion, in der Peptide mit Kupfertartrat-Lösung und mit Folin-Reagenz reagieren. Dabei bildet sich im alkalischen Milieu ein Kupfer(II)-Protein-Komplex, der das gelbe Folin (Molybdän(V)- und Wolfram (VI)-Heteropolysäure) zu Molybdänblau reduziert. Die resultierte Farbintensität wird bei 660 nm quantitativ anhand einer Standardverdünnungsreihe bestimmt (Lowry et al., 1951).

Für den Assay werden 5 µl verdünnte Probe oder Standardlösung in eine 96-well-Platte pipettiert. Als Standard wurden 5 µl der Verdünnungsreihe der BSA-Lösung (Protein Assay Standard II Albumin, 2 mg/ml, Bio-Rad Laboratories GmbH) pipettiert. Je 1 ml Reagenz A wird mit 20 µl Reagenz S gemischt und je 25 µl von dem Mix in jede Vertiefung pipettiert. Anschließend werden 200 µl des Folin-Reagenz hinzugefügt (Reagenz B). Nach 15 min Inkubationszeit auf einem Schüttler wird die Absorption bei 660 nm am Spektralphotometer Lambda E (MWG Biotech GmbH) gemessen.

### 3.5.3 Western-Blot (Immunoblot)

Mittels Western-Blot erfolgt zuerst eine elektrophoretische Auftrennung von Proteinen eines Proteingemisches in einer diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese. Dabei werden die Proteine nach Anlegung einer Spannung in einem Sammelgel zu einer Bande fokussiert und anschließend in einem engporigen Trenngel nach Größe aufgetrennt. Die einzelnen Proteinbanden werden anschließend auf eine PVDF-Membran immobilisiert („geblottet“) und mittels spezifischen Erst- und Zweitantikörpern visuell identifiziert.

Zur Durchführung des Experiments wurde die Mini-Protean<sup>®</sup> Tetra Cell Elektrophorese Apparatur mit Mini-Protean<sup>®</sup> TGX<sup>™</sup> Gelen und einfach konzentriertem 10xTris/Glycin/SDS 4-15% Puffer (Bio-Rad Laboratories GmbH) verwendet.

Das Zelllysate wird (Kapitel 3.5.1) in einer Proteinmenge von 20 µg/Tasche mit einem Probenpuffer (Lane marker sample buffer (5x), Thermo Science) gemischt und auf ein Endvolumen von 20 µl mit ddH<sub>2</sub>O eingestellt. Zur Linearisierung der Proteinstruktur werden die Proben 5 min lang bei 95 °C erhitzt, im Anschluss bei RT abgekühlt und dann kurz anzentrifugiert. Als Größenmarker dient der MagicMark<sup>™</sup> XP Standard (1 µl) und Page Ruler Prestained Protein Ladder (2 µl). Die Auftrennung erfolgt am Bio-Rad Power Pac HC Power Supply (Bio-Rad Laboratories GmbH) bei 170 V, 50 min lang. Im Anschluss werden die Proteine vom SDS-Gel auf die Membran (TransBlot Turbo Transfer Pack Midi format 4-15%, 0,2 µm PVDF) in einem TransBlot<sup>®</sup> Turbo<sup>™</sup> Transfer Starter System in 7 min transferiert. Der TransfERNachweis und der erste Hinweis auf eine erfolg-

reiche Auftrennung der Proteine erfolgt durch das Färben der Membran in 2 ml Ponceau S für 10 min. Des Weiteren wird die Membran durch mehrmaliges 10minütiges Waschen mit 1xTBST Puffer gereinigt.

Nach dem Zurechtschneiden der Membran werden diese in einer Blockierungslösung für 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert (Tabelle 3.5). Die Membran wird zweimal 10 min lang in 1xTBST Puffer gewaschen, bevor sie in einer 2 ml Erstantikörperlösung unter entsprechenden Bedingungen inkubiert wird (Tabelle 3.11).

Tabelle 3.11: Western-Blot Antikörper und ihre Bedingungen

Antikörper	Klon	Spezies	Größe [kDa]	Hersteller	Antikörperpuffer Verdünnung, Zeit
Anti- $\beta$ -Aktin	AC-74, monoklonal	Maus, IgG2a	42	Sigma	5%BSA/TBST 1:20000, 1h
STAT1	polyklonal	Kaninchen	84, 91	Cell signaling	5%BSA/TBST 1:1000, O/N, 4°C
Phospho-STAT1 (Ser727)	polyklonal	Kaninchen	91 STAT1 $\alpha$	Cell signaling	5%BSA/TBST 1:1000, O/N, 4°C
Zweitantikörper					
Anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody	monoklonal	Ziege IgG (H&L)		Cell signaling	5%BSA/TBST 1:3000, Raumtemperatur, 1-3 h
Anti-mouse IgG+IgM HRP-linked antibody	polyklonal	Kaninchen IgG+IgM (H&L)		Pierce Antibodies	5%BSA/TBST 1:20000, Raumtemperatur, 35'

Nach der Inkubation mit dem Erstantikörper wird die Membran am nächsten Tag wieder 10 min lang mit 1xTBST Puffer gewaschen. Die Inkubation der Membran mit einem Meerrettichperoxidase-gekoppelten Zweitantikörper erfolgt bei Raumtemperatur, 1-3 h (Tabelle 3.11). Nach dem anschließenden, zweifachen Waschschrift mit 1xTBST Puffer wird die Membran für 5 min im Dunkeln in das ECL-Reagenz eingelegt. Das Chemolumineszenzreagenz reagiert mit der am Zweitantikörper gekoppelten Peroxidase und erzeugt das Lichtsignal, welches die Proteinbanden detektieren lässt.

Die Proteine auf der Membran werden im Fusion FX7 System (Vilber Lourmat) mit der Fusion-Capt Software detektiert und digitale Fotodatei gespeichert. Die quantitative, densitometrische Auswertung der Membranen erfolgt mit der Software ImageJ (Wayne Rasband, NIH).

### 3.5.4 Wiederverwendung der Western-Blot-Membranen („Reproben“)

Das „Reproben“ bietet einen Nachweis von bis zu vier weiteren Proteinen unterschiedlicher Größe auf der gleichen Western-Blot-Membran. Nach der ersten Detektion wird die Membran von den Resten des ECL-Reagenzes im 1xTBST Puffer mehrmals gewaschen und anschließend für 1 h in den Stripping-Puffer auf dem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Im sauren Milieu lösen sich die Antikörper-Komplexe und somit wird die Membran für eine weitere Detektion vorbereitet.

Stripping Puffer:    15 g Glycin  
                             1 g SDS  
                             10 ml Tween<sup>®</sup>20,  
                             1 l ddH<sub>2</sub>O, pH 2,2, im Dunkeln lagern

Nach dem Stripping-Schritt wird die Membran zweimal je 10 min mit 1xTBST gewaschen, um die Reste vom Stripping Puffer zu entfernen. Vor der Inkubation mit dem nächsten Erstantikörper über Nacht wird die Membran für 1 h in eine Blockierungslösung gelegt, um die unspezifischen Bindungsstellen zu überdecken.

### 3.5.5 Zytokin-Array-Assay

Der Zytokin-Array-Assay ist eine schnelle, sensitive und semiquantitative Detektionsmethode zur Erstellung eines Zytokin-Expressionsprofils. Das Prinzip des Array-Assays basiert auf dem Prinzip des „Sandwich-ELISA“. Spezifische Erstantikörper zur Detektion ausgewählter Zytokine sind auf einer Nitrozellulosemembran kreisförmig (Spot) und in Duplikaten angebracht. Durch Inkubation der zu untersuchenden Proben mit Biotin-gekoppelten Zweitantikörpern bildet sich ein Antikörper-Zytokin-Komplex, der anschließend durch Erstantikörper auf der Membran gebunden und fixiert wird. Es entsteht ein „Sandwich-Komplex“ aus Erstantikörper-Zytokin-Zweitantikörpern. Nach Entfernen des ungebundenen Materials wird das Biotin mittels HRP-konjugiertem Streptavidin und Chemolumineszenzreagenz detektiert.

Die embryonalen Primärneuronen (8 DIV) werden in einer 6-well-Platte,  $3 \times 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup> mit mIFN- $\alpha$  (1000 IU/ml), Poly(I:C) (100  $\mu$ g/ml) und der Kombination aus beiden für 24 h stimuliert. Der Versuch wird pro Probe in drei Replikaten durchgeführt. Nach 24 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wird der Kulturüberstand gesammelt und direkt in das Proteome Profiler<sup>™</sup> Mouse Cytokine Array Panel A, Antibody Array Kit (R&D Systems) eingesetzt oder bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

#### Durchführung

Die Array-Membranen werden in mitgelieferten 4-well-multi-Platten mit 2 ml Blockpuffer (Arraypuffer 6) überdeckt und bei Raumtemperatur 1 h lang auf dem Schüttler inkubiert. Währenddessen werden die Proben vorbereitet, in dem man die Probenüberstände mit 0,5 ml Arraypuffer 4 mischt und auf das Endvolumen von 1,5 ml mit Arraypuffer 6 einstellt. Anschließend werden 15  $\mu$ l von

dem Mouse Cytokine Array Panel A Detection Array Cocktail (biotinylierter Antikörpermix) zu jeder Probe hinzugegeben und bei Raumtemperatur 1 h inkubiert. Nach dem Membran-„blocking“ werden die Proben auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Die Membran wird mit 20 ml 1xWaschpuffer auf dem Schüttler drei Mal für je 10 min gewaschen. Das verdünnte HRP-konjugierte Streptavidin wird im Blockpuffer verdünnt und je 2 ml in die 4-well-Platte pipettiert. Die Membranen werden darin 30 min lang bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert und anschließend mit dem Waschpuffer gewaschen. Danach werden die Membranen 1 min lang in 1 ml Chemi Reagent Mix inkubiert. Dann werden die Membranen getrocknet und die Zytokinspots im Fusion FX7 System (Vilber Lourmat) mit der Fusion-Capt Software nach der Expositionszeit von 101 s detektiert und fotografiert. Die quantitative Auswertung der Zytokin-Arrays erfolgt mit der Software ImageJ (Wayne Rasband, NIH).

### 3.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Versuchsdaten erfolgt mit Microsoft® Excel und GraphPad Prism 5.0 Software. Um die statistische Signifikanz der Daten feststellen zu können, wird aufgrund der kleinen Datenumfänge und der ungepaarten Stichproben sowie der Normalverteilung, der Student-t-Test angewendet. Der t-Test vergleicht zwei Mittelwerte der Grundgesamtheit miteinander. Der errechnete Signifikanzwert der Nullhypothese wird mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % ermittelt. Das Signifikanzniveau liegt bei  $p < 0.05$  (\*) bei  $p < 0.01$  (\*\*) und bei  $p < 0.001$  (\*\*\*)



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Überexpression der „Depressionsgene“ in einer hippocampalen Zelllinie HT22

Eine selektive Hypersensitivität der 15 depressionsassoziierten IFN-Antwortgene („Depressionsgene“) wurde im Blut von HCV-Patienten während der IFN-Therapie und im postmortalen Gehirn von suizidgefährdeten Individuen entdeckt (C. Hoyo-Becerra, Huebener, A., et al., 2013; Schlaak et al., 2012). Der Mechanismus dieser Regulation blieb jedoch unklar. Die Entwicklung eines *in vitro*-Systems, welches eine IFN-Therapie bei HCV-Patienten imitiert, sollte im Rahmen der vorliegenden Dissertation neue Erkenntnisse über die Regulation und Entstehung einer IFN-vermittelten Depression bringen.

Der Hippocampus ist eine der zentralen Strukturen des limbischen Systems und ist für Gedächtnis, Affektivverhalten und Kognition verantwortlich. Er wurde weitgehend in Personen mit psychiatrischen und neurologischen Störungen in den letzten zehn Jahren intensiv untersucht (Mendez-David et al., 2013). In diesem Zusammenhang stellt sich eine hippocampale Zellkultur als geeignetes Modell zur molekularbiologischen Untersuchung der 15 IFN-stimulierbaren „Depressionsgene“ *in vitro* dar.

In der vorliegenden Arbeit wurde die IFN-Antwort von „Depressionsgenen“ in einem sekundären Zellkulturmodell der Zelllinie HT22 untersucht. Die Zelllinie HT22 ist ein Subklon der neuronalen Zelllinie HT4, die aus dem Hippocampus einer Maus isoliert und mittels temperatursensitivem Onkogen SV40 T-Antigen immortalisiert wurde. Die HT22-Zellen werden aufgrund der Glutaminsensitivität selektioniert (Frederiksen et al., 1988).

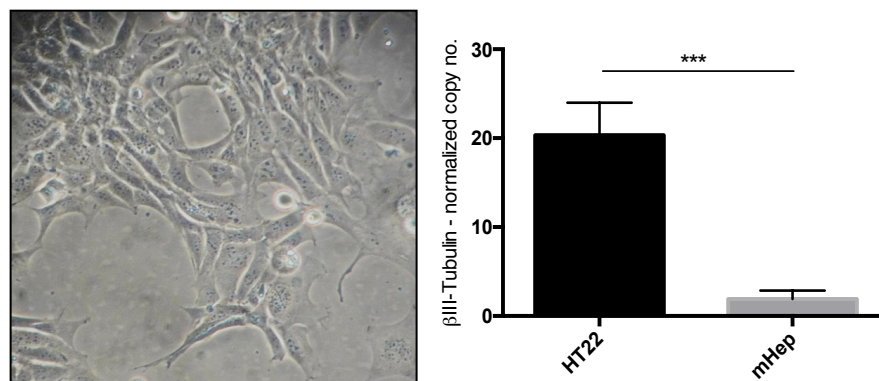


Abbildung 4.1: HT22 Zellen und ihre neuronale Spezifität. (A) HT22 Zellen nach 24 h Inkubation; Phasenkontrast (20x); (B) Nachweis der neuronalen Spezifität von HT22 Zellen anhand der Expression von  $\beta$ III-Tubulin. mHep: murine Hepatozyten als Kontrolle. Die Normalisierung erfolgt gegen 1000 Kopien Actb. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt, \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; (n=3).

Der Vorteil einer permanenten Zelllinie liegt darin, dass sie jederzeit nahezu unverändert zur Verfügung steht und dadurch zeitlich ausgedehnte reproduzierbare Analysen ermöglicht. In der Abbildung 4.1 ist eine mikroskopische Aufnahme der Zellen der Zelllinie HT22 nach 24 h Inkubation in DMEM Medium dargestellt. Hippocampale HT22 Zellen haben im Vergleich zu primären hippocampalen Neuronen eine veränderte Morphologie („transformierter Phänotyp“) und verfügen über ein unbegrenztes Zellteilungspotenzial. Ihre morphologische Beschaffenheit ähnelt stark der von Fibroblasten. Die Kontrolle der neurologischen Zelleigenschaften der HT22 Zellen wurde anhand der Genexpressionsanalyse vom Neuromarker  $\beta$ III-Tubulin bestimmt. Tubulin ist die Hauptkomponente der Mikrotubuli, ein essentielles Zellzytoskelettprotein, das an der Mitose, der Zytokinese und an dem Vesikel- und Organellentransport beteiligt ist.  $\beta$ III-Tubulin ist eine Isoform mehrerer  $\beta$ -Tubuline und wird als ein neurospezifischer Marker angesehen. Die HT22 Zellen zeigen gegenüber den als Kontrolle dienenden murinen Hepatozyten ein signifikant erhöhtes Expressionslevel des Neuromarkers (Abbildung 4.1).

Zur Bestimmung der Stimulationsbedingungen für mIFN- $\alpha$  wurde die primäre Antwort der klassischen Interferon-stimulierbaren Gene (ISG) *Mx2* und *Ifit1* mittels qRT-PCR ermittelt. Dabei wurden verschiedene Zeitpunkte zwischen 2 h und 48 h und mIFN- $\alpha$ -Konzentrationen 10, 100, 1000 IU/ml eingesetzt. Die maximale Hochregulierung von *Mx2* und *Ifit1* findet nach 24 h mit 1000 IU/ml statt (Abbildung 4.2). Diese Parameter werden als Standard-Versuchsbedingungen festgelegt.

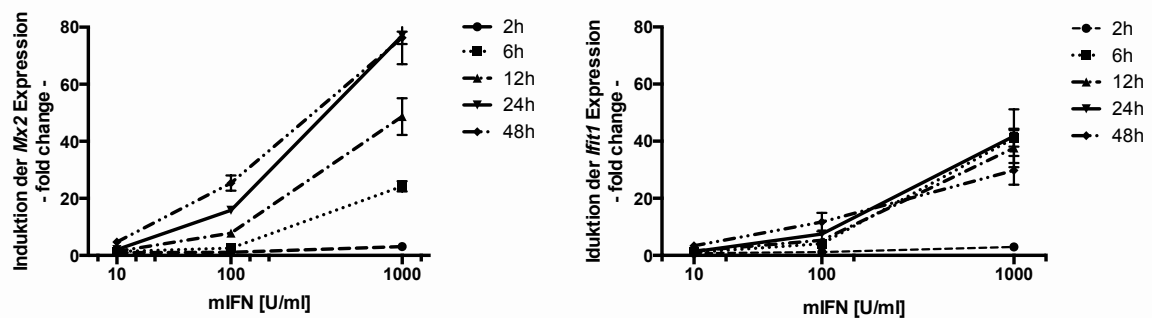


Abbildung 4.2: Bestimmung der Stimulationsbedingungen (c, t) für die Zelllinie HT22. Expressionsniveau der klassischen IFN-stimulierten Genen *Mx2* und *Ifit1* nach Stimulation mit mIFN- $\alpha$  in HT22 Zellen. Die ermittelten Werte sind gegen 1.000 Actb Kopien normalisiert. Im Vergleich zur Kontrolle wird nach 24 h und mit 1000 IU/ml mIFN- $\alpha$  eine mehrfache Hochregulierung von *Mx2* und *Ifit1* festgestellt (n=3).

Zu den ausgewählten Stimulationsbedingungen wurden die Expressionslevel der 15 Kandidatengene in Zelllinie HT22 untersucht. Eine signifikante Hochregulierung aller depressionsassoziierten Gene – bis auf *Mef2a* und *St3gal5* – wurde nach einer 24 h-Stimulation mit mIFN- $\alpha$  (1000 IU/ml) mittels quantitativer RT-PCR nachgewiesen (Abbildung 4.3).

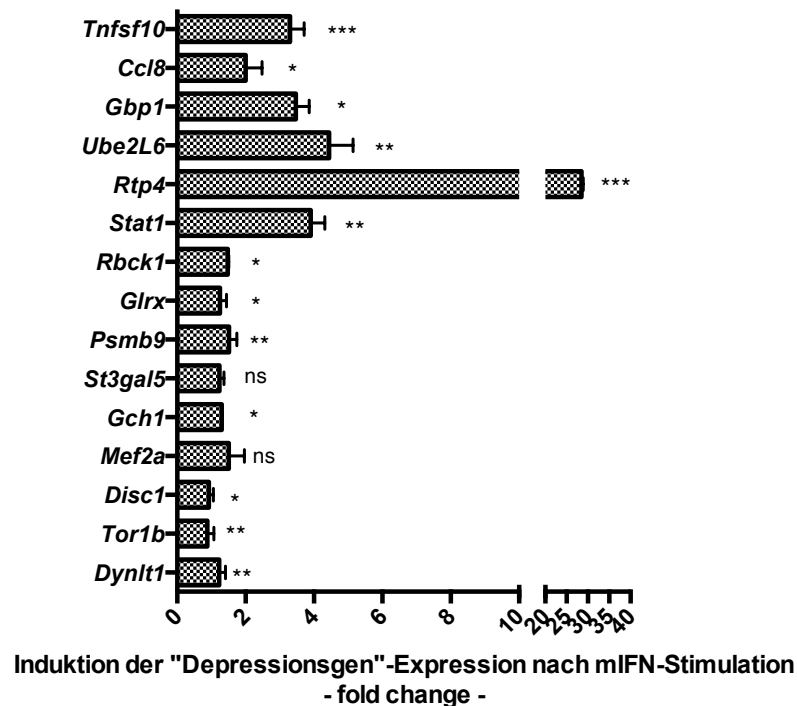


Abbildung 4.3: Überexpression von 15 depressionsassoziierten Genen als Antwort auf die IFN-Stimulation in HT22 Zellen. Nach der Isolierung der totalen RNA wird die Expression von depressionsassoziierten Genen mithilfe der quantitativen RT-PCR validiert. Abgesehen von den Genen *Mef2a* und *St3gal5* erweisen sich die Expressionslevel gegenüber der Kontrolle als signifikant erhöht. Die Normalisierung erfolgt gegen 1000 Kopien Actb und unbehandelte Kontrollen. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt, \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; (n=3).

Die Ergebnisse der qRT-PCR zeigen eine Antwort der depressionsassoziierten Gene auf die Stimulation mit exogenem mIFN- $\alpha$  nach 24 h. Vergleichbar zur unbehandelten Kontrolle führt eine exogene mIFN- $\alpha$ -Stimulation zu einer signifikanten Hochregulierung bei 13 von 15 Genen (Abbildung 4.3). Die Expression von *Rtp4*, *Ube2L6*, *Gbp1*, *Tnfrsf10* und *Stat1* wird durch IFN signifikant erhöht. Die restlichen „Depressionsgene“ sind schwach hochreguliert. Es wird jedoch kein signifikanter Unterschied bei *St3gal5* und *Mef2a* beobachtet. Somit wurde die Sensitivität der „Depressionsgene“ gegenüber mIFN- $\alpha$  und ihre daraus resultierende erhöhte Expression in einem Zellkulturmodell der hippocampalen Zelllinie HT22 gezeigt.

## 4.2 mIFN- $\alpha$ und Poly(I:C)-vermittelte Überexpression der „Depressionsgene“ in murinen Primärneuronen

Die Zelllinie HT22 diente als Ausgangsbasis für die initiale Untersuchung einer IFN-Antwort der „Depressionsgene“ in einem Zellkulturmodell. Neben dem großen Vorteil der unbegrenzten Teilungsfähigkeit und der ständigen Verfügbarkeit der Zelllinie existiert jedoch ein entscheidender Nachteil: Sie besitzt wenige ihrer ursprünglichen *in vivo*-Charakteristika. Die Primärkulturen hingegen behalten gewöhnlich die meisten Eigenschaften und Charakteristika, durch die sie *in vivo* gekennzeichnet sind, auch eine gewisse Zeit *in vitro* bei. Da sie sich in ihrem Genexpressionsprofil

teils erheblich von den transformierten Zellen einer Zelllinie unterscheiden, werden Primärzellen bevorzugt für Genexpressionsanalysen herangezogen.

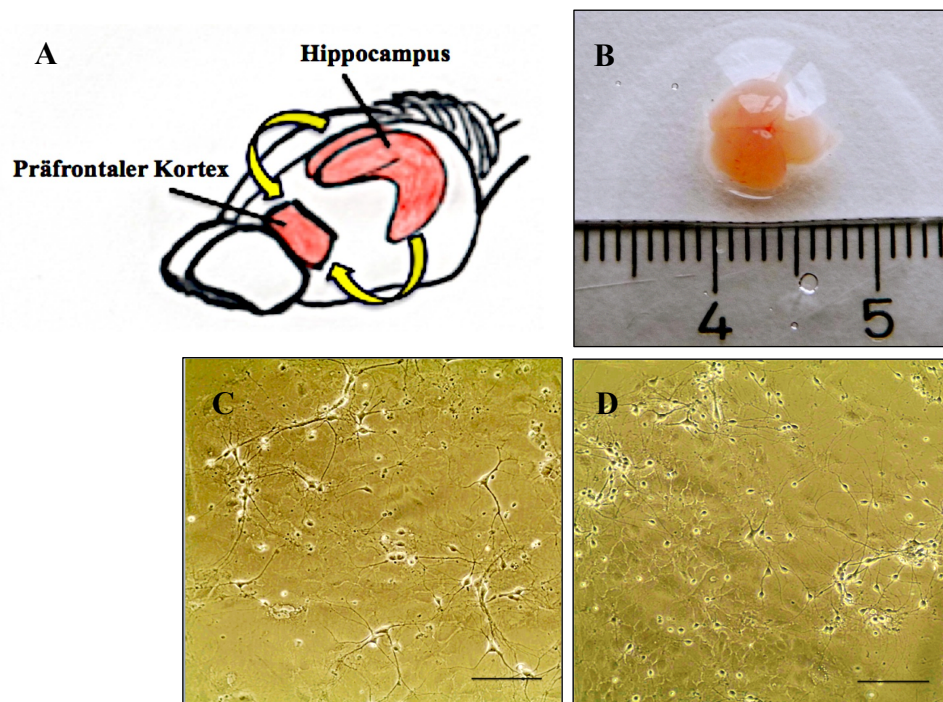


Abbildung 4.4: Isoliertes embryonales Mausgehirn und Zellkultur aus primären hippocampalen und kortikalen Neuronen. (A) Eine schematische Darstellung eines Mausgehirns mit markierten roten Gehirnbereichen des Hippocampus und des präfrontalen Kortexes. (B) Isoliertes Gehirn eines C57BL/6-Mausembryos (E18); (C) Primärkultur der hippocampalen und (D) präfrontalen Kortex-Zellen (8 DIV, Balkenlänge 100 µm).

Hierzu wurden hippocampale und kortikale Primärneuronen aus den C57BL/6-Mausembryonen isoliert (Kapitel 3.2.5 und 3.2.6) und für die Analyse des Expressionsprofils depressionsassoziierter IFN-Antwortgene verwendet (Abbildung 4.4). Der präfrontale Kortex zählt neben dem Hippocampus zu den wichtigsten Gehirnbereichen, die an der Pathogenese von depressiven Symptomen beteiligt sind (Sibille et al., 2004).

Zu Experimentbeginn wurden die Stimulationsbedingungen für mIFN- $\alpha$  in der neuronalen Primärkultur bestimmt. Dabei wurde die dosisabhängige Wirkung von mIFN- $\alpha$  auf die Induktion der klassischen ISG, *Mx2* und *Ifit1*, mittels qRT-PCR validiert (Abbildung 4.5).

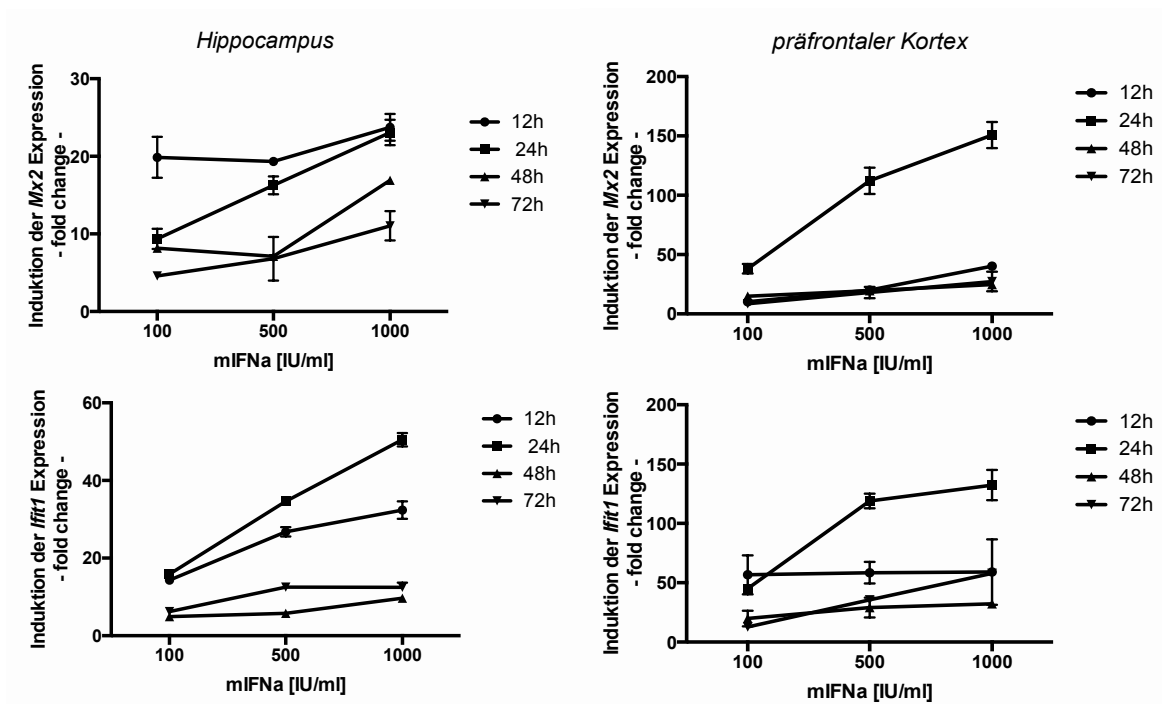


Abbildung 4.5: Ermittlung der Stimulationsbedingungen für mIFN- $\alpha$ -Stimulation in murinen, hippocampalen und kortikalen Primärzellen *in vitro*. Die Analyse des Expressionsniveaus der klassischen ISG, *Mx2* und *Ifit1*, erfolgt nach Isolierung der Gesamt-RNA mittels quantitativer RT-PCR. Eine mehrfache Hochregulierung von *Mx2* und *Ifit1* wird nach 24 h und 1000 IU/ml mIFN- $\alpha$  in beiden Hirngeweben im Vergleich zu Kontrolle festgestellt. Die Normalisierung erfolgt gegen 1000 Kopien Actb und unbehandelte Kontrollen. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt (n=3).

Die dosisabhängige IFN-stimulierte Expression der klassischen ISG ist in Abbildung 4.5 dargestellt. In beiden Gewebearten wird eine starke Induktion von *Ifit1* und *Mx2* bei 1000 IU/ml nach 24 h festgestellt. Diese Parameter werden als Standardbedingungen für weitere Versuche mit neuronalen Primärzellen festgelegt.

Das Ziel dieses primären, neuronalen *in vitro*-Systems ist, die Bedingungen einer IFN-Therapie während der HCV-Infektion möglichst gut nachzuahmen. Es häufen sich die Hinweise aus der aktuellen Literatur, dass das Hepatitis-C-Virus nicht nur Hepatozyten infiziert, sondern während der Virämiephase auch ins Gehirn vordringt. In diversen Zellen des Gehirns wurden HCV-Sequenzen und replikative Formen identifiziert (Fletcher et al., 2012). Während einer Infektion erkennen transmembrane Rezeptoren, die Toll-like-Rezeptoren (TLRs), den Erreger (Kapitel 1.3.1). TLRs sind ein Teil des angeborenen Immunsystems und initiieren die adaptive Immunantwort. Die doppelsträngigen RNA (dsRNA) des HCV wird durch den Toll-like Rezeptor 3 (TLR3) erkannt. Dabei geht TLR3 eine Bindung mit der dsRNA ein und löst eine Immunantwort der Zellen aus. Um virale Infektionen *in vitro* zu simulieren, wurde ein synthetisches Analogon einer dsRNA, das Poly(I:C), eingesetzt. Sein molekulares Stimulationsmuster ähnelt dem Genexpressionsmuster bei einer Virusinfektion. Wie schon 2007 von Cameron et al. beschrieben wurde, exprimieren neuronale Zellen

den Toll-like Rezeptor 3 (TLR3) und werden durch Poly(I:C), den Agonisten des TLR3, aktiviert (Cameron et al., 2007).

Um eine IFN-Therapie unter HCV-Infektion *in vitro* zu imitieren, wurde in der vorliegenden Arbeit eine Kombination aus mIFN- $\alpha$  und Poly(I:C) in primären Neuronen verwendet. Die induktive Wirkung von Poly(I:C) (0-100  $\mu\text{g/ml}$ ) auf die Expression klassischer ISG, *Mx2* und *Ifit1*, wurde in kortikalen und hippocampalen Neuronen über 24 h untersucht (Abbildung 4.6).

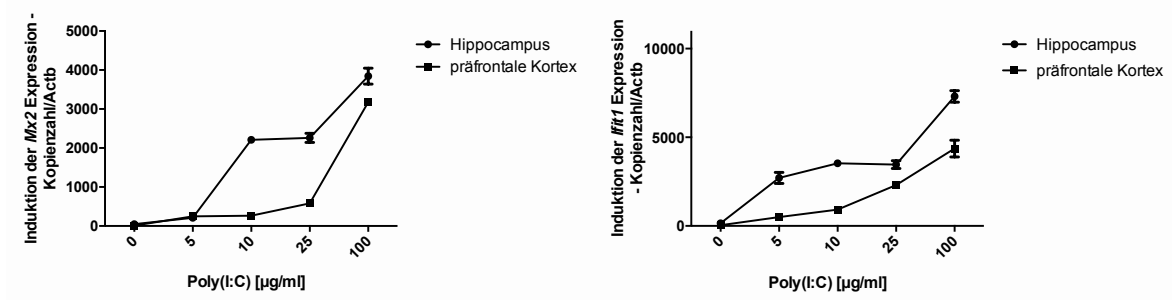


Abbildung 4.6: Dosisfindung von Poly(I:C) anhand der Expression von ISG in neuronalen Primärzellen *in vitro*. Die Induktion von *Mx2* und *Ifit1* wurde mittels quantitativer RT-PCR bestimmt und gegen 1000 Kopien Actb normalisiert. Nach der Behandlung mit TLR3 Agonisten Poly(I:C) konnte eine Steigerung der Genexpression gegenüber der unbehandelten Kontrolle bei 100  $\mu\text{g/ml}$ , nach 24 h festgestellt werden.

Wie in der Abbildung 4.6 dargestellt, induziert Poly(I:C) eine dosisabhängige Expression von *Mx2* und *Ifit1*. Ein starker Anstieg der ISG-Expression ist während der Stimulation mit 100  $\mu\text{g/ml}$  Poly(I:C) zu beobachten. Die so ermittelten optimalen Stimulationsbedingungen von 100  $\mu\text{g/ml}$  Poly(I:C) über 24 h wurden als Standardbedingungen für die weiteren Experimente festgelegt.

#### 4.2.1 Überexpression depressionsassoziiierter IFN-Antwortgene in hippocampalen und kortikalen Primärneuronen

Die Genexpressionsanalyse von 15 Kandidatengenen wird nach der Stimulation mit mIFN- $\alpha$  (1000 IU/ml) und mit Poly(I:C) (100  $\mu\text{g/ml}$ ) für 24 h in hippocampalen und kortikalen Neuronen (8 DIV) mittels qRT-PCR validiert (Kapitel 3.3.2 und 3.4.2). Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.7 dargestellt.

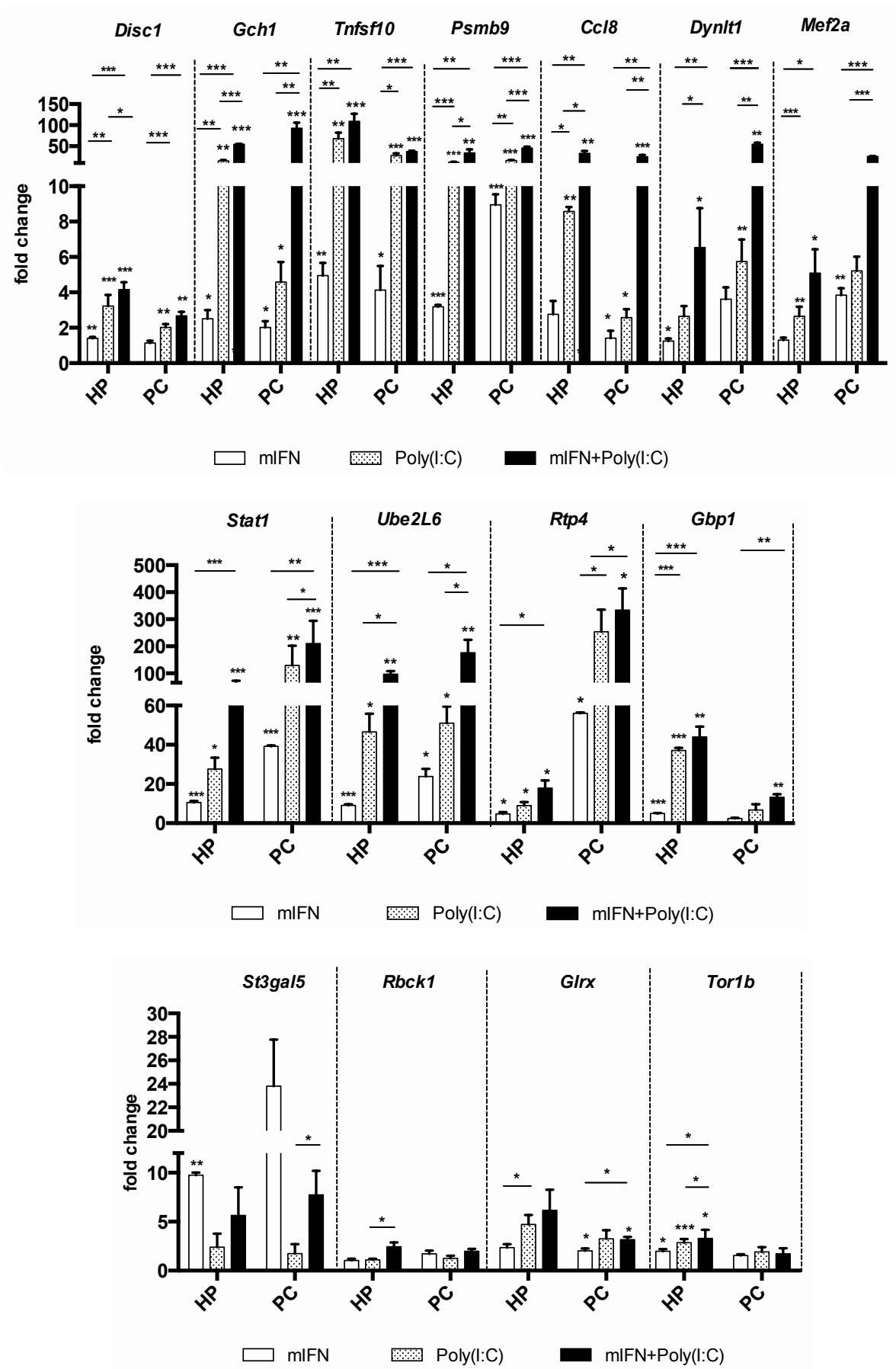


Abbildung 4.7: mIFN- $\alpha$  und Poly(I:C)-vermittelte Induktion der „Depressionsgene“ in primären, hippocampalen und kortikalen Zellen. Die Stimulation der neuronalen Zellen aus beiden Geweben erfolgt mit mIFN- $\alpha$  (1000 IU/ml) und mit Poly(I:C) 100  $\mu$ g/ml einzeln und in Kombination am 8 DIV für 24 h. Nach der Isolierung der Gesamt-RNA werden mithilfe der quantitativen RT-PCR die Expressionslevel der 15 depressionsassoziierten Gene untersucht. Eine starke Überexpression besonders während der Kostimulation ist in 11 von 15 „Depressionsgenen“ zu beobachten. Die Normalisierung erfolgt gegen 1000 Kopien Actb und gegen unbehandelte Kontrollen. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt, \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; (n=3).

Wie in Abbildung 4.7 dargestellt, zeigen die depressionsassoziierten IFN-Antwortgene einen mIFN- $\alpha$ /Poly(I:C)-vermittelten Anstieg der Expression während der Kostimulation. Fast alle „Depressionsgene“ weisen eine signifikant erhöhte mRNA-Expression in beiden Geweben auf. *Dynl1*, *Mef2a*, *Tor1b*, *Disc1*, *St3gal5* und *Gch1* wurden bereits mit schweren Depressionen bzw. neuronalen Entwicklungsvorgängen im Gehirn assoziiert (zusammengefasst in Schlaak et al., 2012). Diese Gene zeigen ähnliche Expressionsmuster nach der IFN/Poly(I:C)-Stimulation: Signifikant erhöhte Expressionslevel während der Kostimulation sowohl im Hippocampus als auch im präfrontalen Kortex. *Stat1*, *Ube2L6*, *Rtp4*, *Gbp1* sind ISG und werden ebenfalls während der Kostimulation signifikant erhöht exprimiert. *Rbck1*, *Glrx*, *Tor1b* zeigen hingegen einen Trend zur erhöhten Expression während der Kostimulation jedoch besonders in PC (präfrontaler Kortex) keine Signifikanz. Die Genexpression von *St3gal5* zeigt ein unerwartetes Ergebnis. Nämlich eine leichte Suppression während der Kostimulation.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird durch eine exogene Interferongabe in Kombination mit Immunstimulans Poly(I:C) eine Überexpression der depressionsassoziierten Gene in hippocampaler und kortikaler Primärkultur *in vitro* gezeigt. Für die meisten „Depressionsgene“ kann besonders durch Kostimulation eine stark erhöhte Expression nachgewiesen werden. Dies deutet auf eine Hypersensitivität der Gehirnzellen auf mIFN- $\alpha$  und Poly(I:C) hin, was die mögliche Entwicklung einer exogenen/endogenen Depression begünstigen kann.

### 4.3 Anstieg von proinflammatorischen Zytokinen durch mIFN- $\alpha$ und Poly(I:C)

Nach dem Sensitivitätsnachweis depressionsassoziiierter Gene gegenüber mIFN- $\alpha$  und Poly(I:C) in murinen hippocampalen und kortikalen Neuronen *in vitro*, wurde zusätzlich der Einfluss von mIFN- $\alpha$  und Poly(I:C) auf die Veränderung von proinflammatorischen Zytokinen auf Protein- und Genexpressionsebene in neuronaler Primärzellkultur untersucht. Dazu wurden hippocampale und kortikale Neuronen unter Standardbedingungen gemäß den Dosisfindungsversuchen stimuliert (s. Kapitel 3.3.2). Die Zellkulturüberstände wurden in ein Mouse Cytokine Array (R&D Systems) eingesetzt, um die Transkriptionsergebnisse auf Ebene der Zytokinproduktion zu validieren (Kapitel 3.5.5).



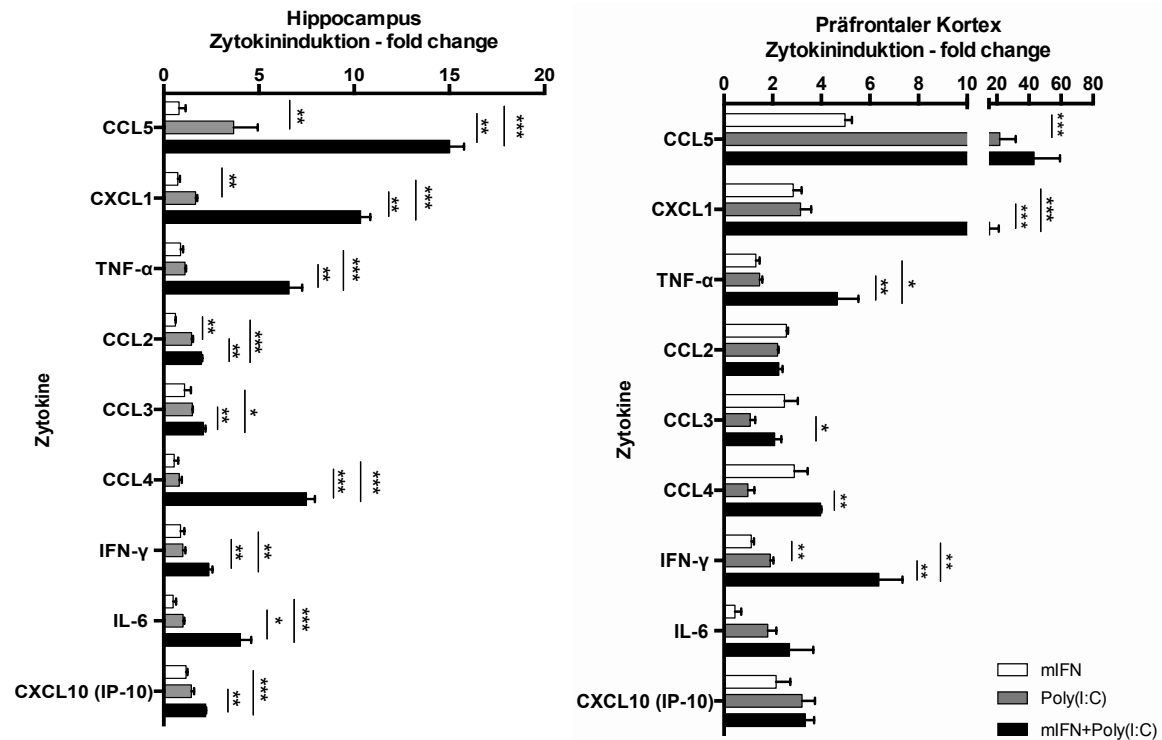


Abbildung 4.8: mIFN- $\alpha$ /Poly(I:C)-vermittelte Zytokin-/Chemokininduktion auf Proteinebene in primären murinen, hippocampalen, HP, und kortikalen Neuronen, PC. Die Zellkulturüberstände der stimulierten Neuronen werden im Proteome Profiler Mouse Cytokine Array Kit (Panel A, R&D Systems) untersucht. Eine signifikant erhöhte Expression der Zytokine/Chemokine ist im Vergleich zur mIFN- $\alpha$ -Monostimulation besonders im Hippocampus während der Kostimulation zu sehen. Die Normierung der Werte erfolgt gegen die Werte unbehandelter Kontrollen. Die Daten sind als Mittelwerte ( $\pm$ SEM) dargestellt, \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; (n=3).

Die Ergebnisse des Mouse Cytokine Arrays (R&D Systems) zeigen, dass die Menge an proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen während der Kostimulation signifikant gegenüber der mIFN- $\alpha$ /Poly(I:C)-Monostimulation erhöht ist. Die Expressionslevel der Zytokine/Chemokine CCL5, CXCL1, TNF, CCL3, CCL4 und IFN- $\gamma$  sind in beiden Geweben signifikant erhöht, während die von CCL2, IL6 und CXCL10 nur im HP (Hippocampus) erhöht sind (Abbildung 4.8).

Anhand der Ergebnisse des Mouse Cytokine Arrays wurde eine Auswahl von signifikant erhöht exprimierten Zytokinen/Chemokinen getroffen, welche weiter molekularbiologisch untersucht wurden. Dabei wurde die mRNA-Expression von *Cxcl1*, *Ccl5*, *Il6*, *Cxcl10*, *Ifng* und *Tnf* nach 24 h mIFN- $\alpha$  /Poly(I:C)-Stimulation mittels quantitativer qRT-PCR validiert (Kapitel 3.4.2).

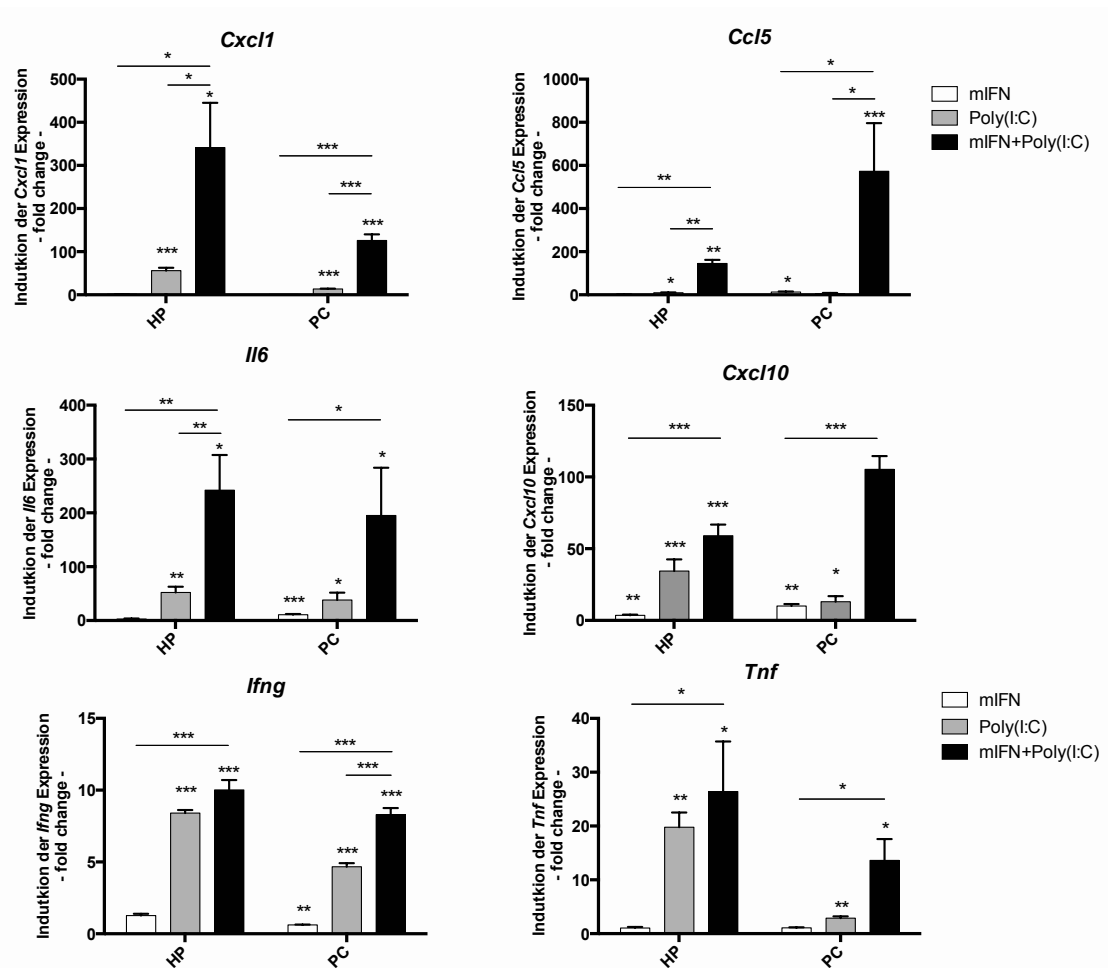


Abbildung 4.9: Erhöhte Expressionslevel depressionsassoziiert Zytokine/Chemokine in hippocampalen und kortikalen Neuronen nach mIFN- $\alpha$ /Poly(I:C)-Stimulation. mRNA-Expressionslevel von *Cxcl1*, *Ccl5*, *Cxcl10*, *Il6*, *Ifng* und *Tnf* wird nach mIFN- $\alpha$ /Poly(I:C)-Stimulation mittels qRT-PCR genauer untersucht. Eine signifikant erhöhte Genexpression von proinflammatorischen Zytokinen ist besonders während der Kostimulation zu beobachten. Die Normalisierung erfolgt gegen 1.000 Kopien Actb und unbehandelte Kontrollen. Die Daten sind als Mittelwerte ( $\pm$ SEM) dargestellt, \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; (n=3).

Wie in Abbildung 4.9 dargestellt, ist ein signifikanter Anstieg der Genexpression von *Cxcl1*, *Ccl5*, *Cxcl10*, *Il6*, *Ifng* und *Tnf* besonders während der Kostimulation zu beobachten. Besonders *Ccl5*, *Cxcl1* und *Il6* sind im Vergleich zu anderen untersuchten Zytokinen/Chemokinen stark exprimiert. Ein induktiver Effekt der mIFN- $\alpha$ /Poly(I:C)-Stimulation auf die verstärkte Zytokin- und Chemokinproduktion wird sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinexpressionsebene in hippocampalen und kortikalen Neuronen *in vitro* gezeigt. Diese Ergebnisse deuten drauf hin, dass eine signifikant erhöhte Genexpression der proinflammatorischen Zytokine durch IFN- $\alpha$  und Poly(I:C) direkt induzierbar ist.

#### 4.4 mIFN- $\alpha$ und Poly(I:C) beeinflusst die serotonerge und dopaminerge Aktivität

IFN- $\alpha$  moduliert neben endokrinologischen und immunologischen Veränderungen die Aktivität verschiedener Neurotransmitter, wie Serotonin, Glutamat und Dopamin, die an der Pathophysiologie von psychiatrischen Nebenwirkungen der IFN-Therapie beteiligt sein könnten. Um den Einfluss von mIFN- $\alpha$  und Poly(I:C) auf eine serotonerge, dopaminerge und glutamaterge Aktivität in primären Neuronen zu untersuchen, wurden die Genexpressionslevel von Serotonin- und Dopamintransportern (*Slc6a4/Slc6a3*), Serotoninrezeptor (*Htr1a*) und von dem Tryptophan katalysierenden Enzym Indolamin-2,3-Dioxygenase (*Ido1*) mittels qRT-PCR validiert. Hierzu wurden hippocampale und kortikale Neuronen mit mIFN- $\alpha$  1000 IU/ml und mit Poly(I:C) 100  $\mu$ g/ml einzeln und in Kombination für 24 h stimuliert (Kapitel 3.3.2). Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.10 dargestellt.

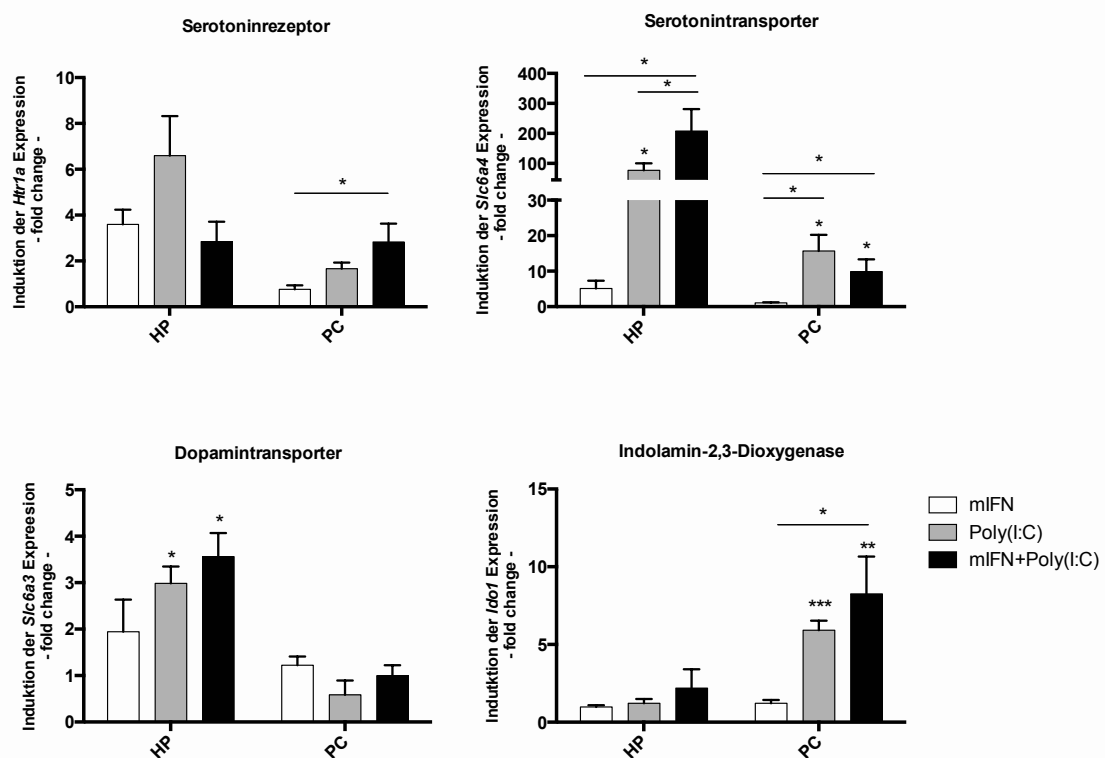


Abbildung 4.10: Veränderte Expressionslevel der Effektormoleküle des serotonergen Systems nach mIFN- $\alpha$ /Poly(I:C)-Stimulation in hippocampalen und kortikalen Neuronen (HP/PC). Nach der mIFN- $\alpha$ /Poly(I:C)-Stimulation von hippocampalen und kortikalen Neuronen wurde die Genexpression mittels quantitativer RT-PCR untersucht. Der Serotonintransporter (*Slc6a4*) wird in beiden Geweben während der Kostimulation signifikant erhöht exprimiert. Die Expression des Serotoninrezeptors (*Htr1a*) ist gewebespezifisch und zeigt eine signifikante Erhöhung nur im PC während der Kostimulation. Der Dopamintransporter (*Slc6a3*) zeigt nur im HP einen tendenziellen Anstieg während der Kostimulation, während nur im PC eine signifikant erhöhte Expression von Indolamin-2,3-Dioxygenase während der Kostimulation zu beobachten ist. Die Normalisierung erfolgt gegen 1.000 Kopien Actb und unbehandelte Kontrollen. Die Daten sind als Mittelwerte ( $\pm$ SEM) dargestellt, \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; (n=3).

Die Abbildung 4.10 zeigt eine gesteigerte Expression von Effektorgenen des serotonergen und

dopaminergen Systems. Die Expression des Serotoninrezeptors (*Htr1a*) scheint in hippocampalen und kortikalen Neuronen divergent zu sein. Die *Htr1a*-Expressionsrate ist im Hippocampus während der Kostimulation niedriger als während der Poly(I:C)-Stimulation. Im präfrontalen Kortex ist die *Htr1a*-Expression während der Kostimulation signifikant erhöht. Die mIFN- $\alpha$ /Poly(I:C)-induzierte Aktivierung des Serotonintransporter (*Slc6a4*) ist während der Kostimulation gegenüber der IFN-Monostimulation in beiden Geweben signifikant erhöht. Die Expression des Enzyms Indolamin-2,3-Dioxygenase (*Ido1*) war nur im präfrontalen Kortex während der Kostimulation signifikant erhöht. Auch im Hippocampus zeigt das *Ido1*-Expressionslevel einen ähnlichen Trend, jedoch keine Signifikanz.

Das *Slc6a3*-Expressionslevel ist im HP (Hippocampus) während der Poly(I:C)- und Ko-Stimulation gegenüber der Kontrolle signifikant erhöht. Im PC (präfrontaler Kortex) wird kein signifikantes Ergebnis erzielt, jedoch ist ein absteigender Trend in der *Slc6a3*-Expression zu beobachten. Diese Ergebnisse stellen deutliche zytokin-induzierte Veränderungen des Neurotransmitter-Metabolismus während einer IFN-Behandlung mit simulierter Virusinfektion dar.

#### 4.5 mIFN- $\alpha$ /Poly(I:C)-vermittelte STAT1-Aktivierung und Folgen der RNAi-vermittelten STAT1-Suppression

IFN- $\alpha$  spielt eine kritische Rolle in der antiviralen Abwehr und in der Regulation des Immunsystems. IFN- $\alpha$  moduliert die zelluläre Genexpression innerhalb des Janus-Kinase (JAK)/ Signaltransduktoren und -aktivatoren der Transkription (STAT)-Signaltransduktionswegs. Die Bindung von IFN- $\alpha$  an seinen Rezeptor löst die Aktivierung der rezeptorassoziierten JAK-1- und TYK2-Kinase aus, die dann STAT1 und STAT2 sequenziell phosphorylieren und zu deren Heterodimerisierung führen. So aktivierte STAT-Dimere binden an den Genpromotor, wodurch die Transkriptionsrate der betroffenen Gene ansteigt. In Patienten mit Hepatitis C wurde STAT1 unter den 15 depression-assoziierten IFN-Antwortgenen entdeckt (Schlaak et al., 2012). Im Kapitel 4.2.1 ist die transkriptionelle Hochregulierung von STAT1 als „Depressionsgen“ gegenüber IFN- $\alpha$ /Poly(I:C) in hippocampalen und kortikalen murinen Neuronen *in vitro* auf Ebene der mRNA gezeigt worden.

In diesem Teil der Arbeit wird die Antwort von STAT1 auf die mIFN- $\alpha$ /Poly(I:C)-Stimulation in primären hippocampalen und kortikalen murinen Neuronen auf Proteinebene untersucht.

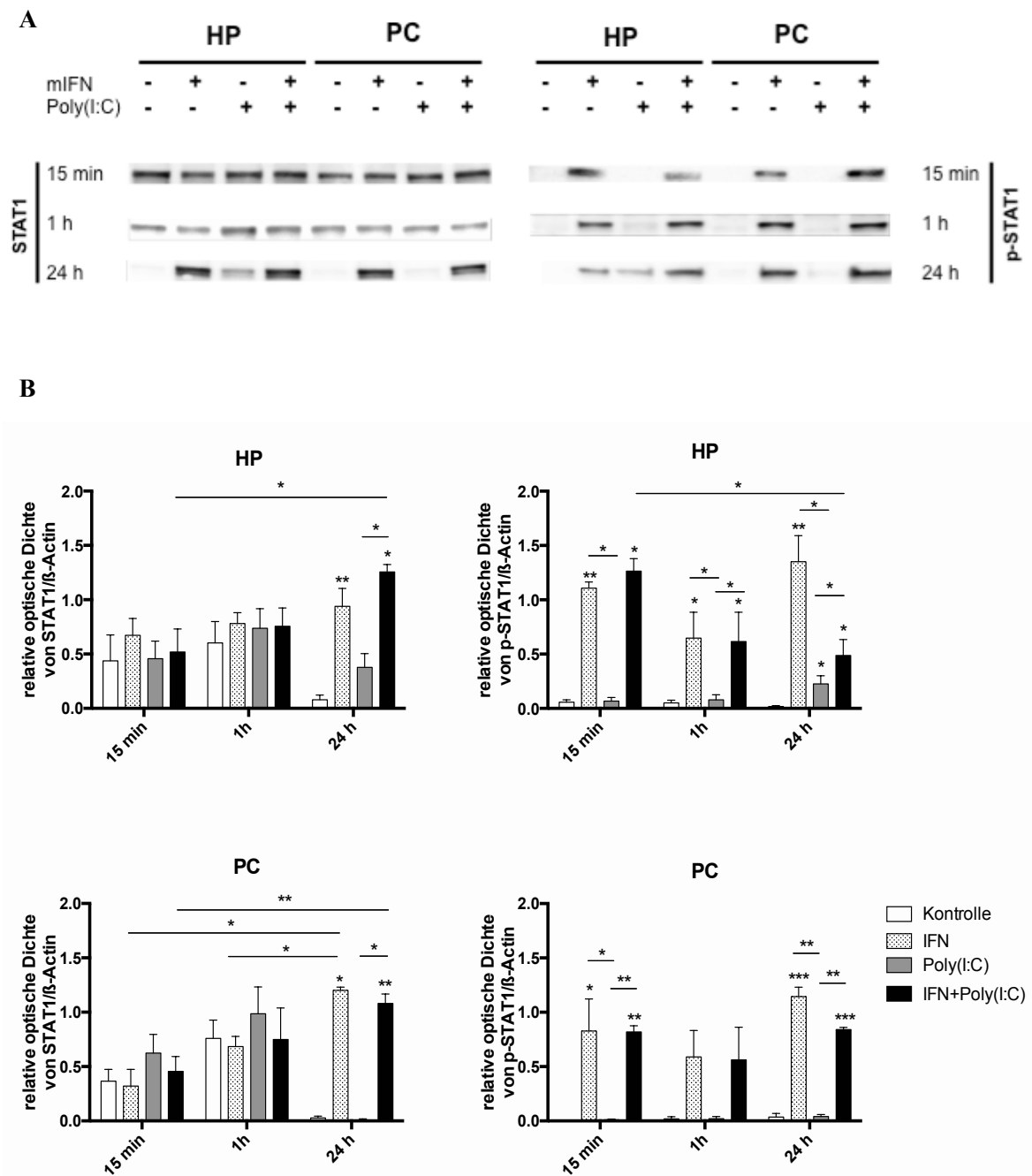


Abbildung 4.11: Western-Blot von STAT1-Gesamtprotein und seiner aktiven Form während der mIFN- $\alpha$ /Poly(I:C)-Stimulation in murinen Neuronen. Hippocampale Neuronen, HP, und kortikale Neuronen, PC, (8 DIV) wurden für 15 min, 1 h und 24 h mit mIFN- $\alpha$  (1000 IU/ml) und Poly(I:C) (100  $\mu$ g/ml) einzeln und in Kombination stimuliert. Die Zellkulturüberstände wurden im Western-Blot analysiert. (A) Repräsentative Western-Blots von STAT1-Gesamtprotein und seiner aktiven Form zu unterschiedlichen Zeitpunkten (15', 1 h, 24 h). (B) Quantifizierung des Western-Blots: Darstellung der densitometrische Auswertung des Western-Blots von STAT1 und p-STAT1. Die Werte der densitometrischen Messung sind gegen die Actb-Werte der jeweiligen Probe normalisiert. Das STAT1-Gesamtprotein wird nach 24 h bei IFN-/Ko-Stimulation in beiden Geweben signifikant erhöht exprimiert. Im Gesamtprotein beider Gewebe wird eine späte Antwort auf die TLR3-Aktivierung durch Poly(I:C) nach 24 h beobachtet. Die Menge an phosphorylierten STAT1 nimmt in HP nach 24 h Kostimulation signifikant ab. In PC wird kein signifikanter Unterschied festgestellt. Die Daten sind als Mittelwerte ( $\pm$ SEM) dargestellt, \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; (n=3).

Nach Stimulation der hippocampalen und kortikalen Neuronen (8 DIV) mit mIFN- $\alpha$  1000 IU und Poly(I:C) 100  $\mu$ g/ml für 15 min, 1 h und 24 h wurde die aktivierte STAT1-Form und das STAT1-Gesamtprotein mittels Western-Blot analysiert (Kapitel 3.5.3). Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.114.11 dargestellt.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Expression vom STAT1-Gesamtprotein erst nach 24 h während der IFN- und IFN/Poly(I:C)-Stimulation in HP (Hippocampus) und PC (präfrontaler Kortex) signifikant ansteigt. Die Menge der aktiven STAT1-Form nimmt besonders in HP während der Ko-Stimulation signifikant ab. In PC wird kein signifikanter Unterschied dabei beobachtet. Im Gegensatz zu den kortikalen Neuronen zeigen hippocampale Neuronen nach 24 h eine spätere Antwort auf die TLR3-Aktivierung durch Induktion der STAT1-Synthese (Gesamtprotein und aktivierte Form) (Abbildung 4.11).

Somit wurde eine Protein-Antwort auf die IFN- $\alpha$ /Poly(I:C)-Stimulation in primären Neuronen gezeigt. Eine hoch spezifische Aktivierung des STAT1 in primären Neuronen durch IFN- $\alpha$ /Poly(I:C) lässt auf die besondere Rolle von STAT1 in murinen Gehirnzellen und die volle Funktionsfähigkeit des JAK-STAT-Signalweges schließen. Die Rolle des STAT1 als mögliches Effektormolekül in der Regulation der „Depressionsgene“ wird durch einen RNAi-vermittelten STAT1-„Knockdown“ im folgenden Teil dieser Arbeit genauer untersucht.

#### 4.5.1 siRNA-vermittelte STAT1-Suppression in primären Neuronen und ihre Stimulierbarkeit mit IFN- $\alpha$ /Poly(I:C)

Mittels RNA-Interferenz-Technologie (Kapitel 3.4.3) wird der Einfluss von STAT1 auf die Expression „Depressionsgene“, die Expression der proinflammatorischen, depressionsassoziierten Zytokine und die Expression der Effektorgene des serotonin-/dopaminergen Systems in kortikalen und hippocampalen Neuronen *in vitro* untersucht.

Kortikale und hippocampale Neuronen wurden mithilfe der FlexiTube GeneSolution (Qiagen) *in vitro* transfiziert. Es ist ein Gen-spezifisches siRNA-Paket von vier vorgewählten siRNA-Sequenzen für das Ziel-Gen *Stat1*. Nach mehreren Optimierungsversuchen wurden die Transfektionsbedingungen für das jeweilige Gewebe im „Knockdown“-Experiment gefunden (Tabelle 4.1). Fett gedruckte Parameter (Konzentrationsangaben in [nM]) wurden für die folgenden Experimente verwendet, weil durch diese die höchste „Knockdown“-Effizienz (HP 74%, PC 71%) erreicht wurde.

Tabelle 4.1: Optimierung der siRNA-Transfektionsbedingungen in hippocampalen und kortikalen Neuronen *in vitro*.

	Hippocampus [HP]	Präfrontaler Kortex [PC]
siStat1 [nM]	„Knockdown“ [%]	
5	39	15
10	59	63
<b>50</b>	<b>74</b>	61
<b>100</b>	58	<b>71</b>

Hippocampale Neuronen wurden mit 50 nM und kortikale Neuronen mit 100 nM für jeweils 24 h transfiziert (Tabelle 3.10). Um einen unspezifischen „off-target“-Effekt berücksichtigen zu können, wird eine unspezifische, nicht-codogene siRNA als Kontrolle (siNC) eingesetzt. Im Anschluss an das „Knockdown“-Experiment werden die Neuronen mit 1000 IU mIFN- $\alpha$ , 100  $\mu$ g/ml Poly(I:C) sowie als Kostimulation für weitere 24 h stimuliert. Die mRNA-Analyse von *Stat1* mittels qRT-PCR ergab die in Abbildung 4.12 dargestellten Ergebnisse.

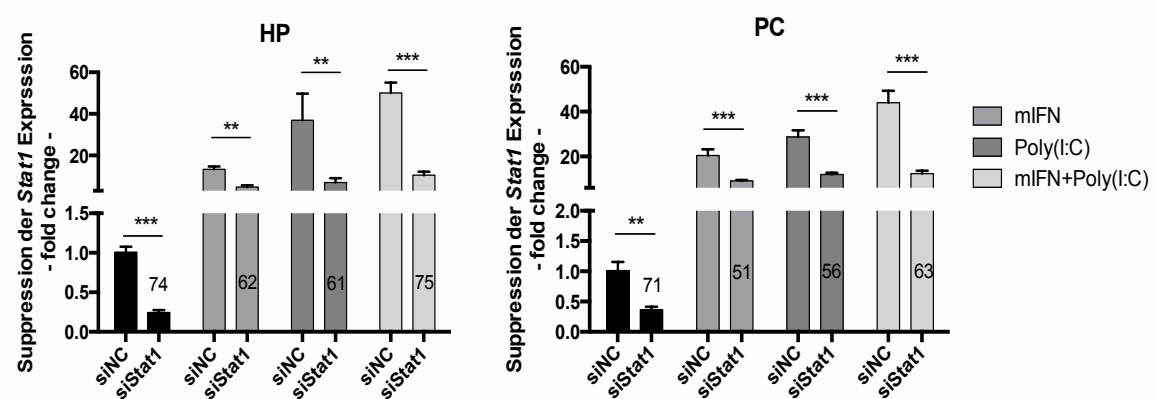


Abbildung 4.12: siRNA-vermittelter *Stat1*-„Knockdown“ und seine Stimulierbarkeit durch mIFN- $\alpha$ /Poly(I:C). Kortikale, PC, und hippocampale Neuronen, HP, wurden am 8 DIV über 24 h mit 50 nM siRNA bzw. 100 nM siRNA transfiziert. Nach dem „Knockdown“-Experiment wurden die Zellen mit mIFN- $\alpha$  1000 IU, Poly(I:C) 100  $\mu$ g/ml für weitere 24 h stimuliert. In beiden Geweben wird eine signifikante *Stat1*-Suppression gegenüber der Negativkontrolle (siNC) gemessen. In Stimulationsansätzen kann ebenfalls ein signifikanter Unterschied zwischen dem siStat1-Ansatz gegenüber der Kontrolle (siNC) beobachtet werden. Die „Knockdown“-Effizienz der *Stat1*-Suppression während der jeweiligen Stimulation ist in den entsprechenden Balken als prozentualer Anteil der siNC-Kontrolle angezeigt. Die *Stat1*-mRNA-Expressionslevel wurden mithilfe der qRT-PCR analysiert, gegen 1.000 Actb Kopien normalisiert und gegen die Negativkontrolle (siNC) abgeglichen. Die Daten sind als Mittelwerte ( $\pm$ SEM) dargestellt, \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; (n=3).

Durch die gezielte posttranskriptionelle Suppression des *Stat1*-Gens mittels siRNA-Technologie wird eine signifikante Reduktion des *Stat1* mRNA-Levels erzielt (Abbildung 4.12). Die Transfektion der hippocampalen Neuronen ergibt eine 74%ige *Stat1*-Suppression. In kortikalen Neuronen wird ein *Stat1*-„Knockdown“ mit 71%iger Suppression erzielt. Nach der anschließenden mIFN- $\alpha$ /Poly(I:C)-Stimulation liegt die Suppressionsrate bei 61-75% im Hippocampus und im präfrontalen Kortex bei 51-63% (Abbildung 4.12).

Die posttranskriptionelle „Down“-Regulation der STAT1-Proteinexpression über 24 h wurde ebenfalls überprüft (Kapitel 3.5.3). Der Proteinextrakt von hippocampalen und kortikalen Neuronen wurde nach der siStat1-Transfektion und nach der anschließenden 24 h-Stimulation mit mIFN- $\alpha$  1000 IU und Poly(I:C) 100  $\mu$ g/ml im Western-Blot analysiert. Die Abbildung 4.13 zeigt das aktivierte STAT1-Protein, p-STAT1 (Ser 727), nach 24 h Suppression und anschließenden 24 h mIFN- $\alpha$ /Poly(I:C)-Stimulation. Als Kontrolle wurde Zelllysate von unbehandelten Zellen verwendet, sowie Zelllysate von Zellen, die mit einer unspezifischen, nicht-codogenen siRNA (siNC) transfiziert wurden.

Auf Proteinebene konnte eine STAT1-„Knockdown“-Effizienz von 35-37% im Hippocampus und von 27% im präfrontalen Kortex gezeigt werden. Zur Verdeutlichung der Ergebnisse wurde eine densitometrische Quantifizierung der Proteinbanden mit der ImageJ-Software (Wayne Rasband, NIH) durchgeführt. Die Normalisierung der Werte erfolgt gegen die optische Dichte von Actb-Banden derselben Proben.

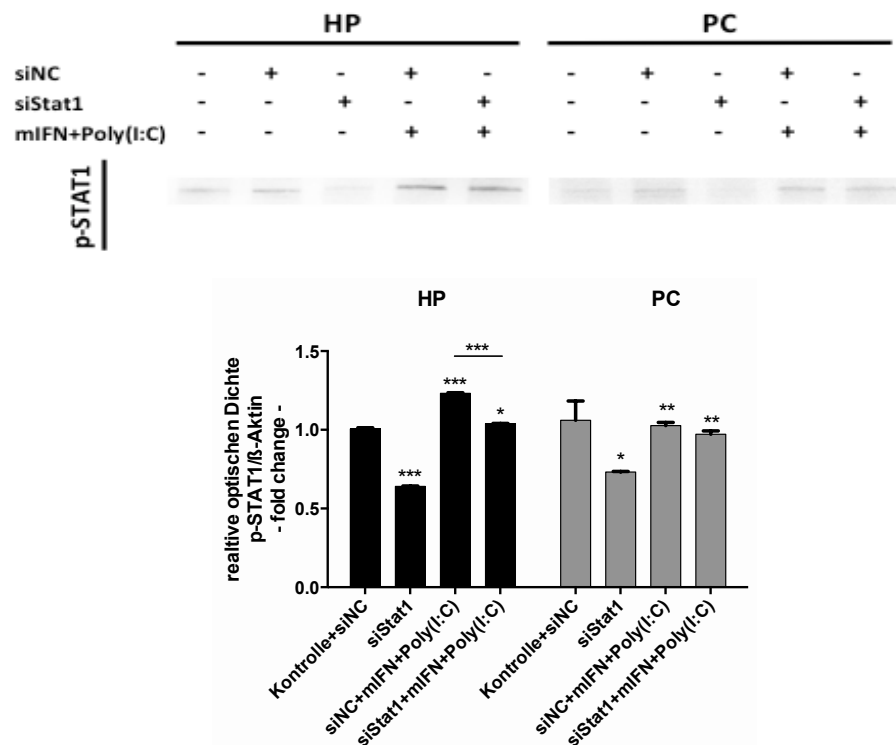


Abbildung 4.13: STAT1-Proteinlevel in hippocampalen und kortikalen Neuronen nach STAT1-„Knockdown“ und mIFN- $\alpha$ /Poly(I:C)-Stimulation. Der Proteinextrakt von hippocampalen, HP, und kortikalen Neuronen, PC, wurde nach der siStat1-Transfektion und nach der anschließenden 24 h-Stimulation mit mIFN- $\alpha$  1000 IU und Poly(I:C) 100  $\mu$ g/ml im Western-Blot analysiert. Die „Knockdown“-Effizienz liegt im HP bei ca. 36% und im PC bei ca. 27% nach 24 h. Als Kontrolle diente Zelllysate unbehandelter Zellen sowie Zelllysate von Zellen, die mit einer unspezifischen, nicht-codogenen siRNA (siNC) transfiziert wurden. Im Vergleich zu stimulierten Zelllysaten (siNC+mIFN+Poly(I:C)) bleibt die suppressierte STAT1-Expression nach der Kostimulation nur im HP signifikant erniedrigt. Die densitometrische Quantifizierung der Banden wurde gegen die Werte von Actb-Banden abgeglichen. Die Werte sind als Mittelwerte ( $\pm$ SEM) dargestellt, \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; (n=3).



Wie in Abbildung 4.13 gezeigt, führt der STAT1-„Knockdown“ gegenüber der Kontrolle in beiden Geweben zu einer signifikant erniedrigten Expression des p-STAT1-Proteins. Es wird eine -STAT1-Stimulierbarkeit durch mIFN- $\alpha$ /Poly(I:C) in STAT1-supprimierten Zellen im Vergleich zu siNC-behandelten, nicht STAT1-supprimierten Zellen gezeigt. Die STAT1-Expression in stimulierten, STAT1-supprimierten Hippocampus-Neurozellen (HP) ist gegenüber der stimulierten, nicht-supprimierten HP-Neurozellen signifikant niedrig. In kortikalen Neuronen hingegen wird nur eine tendenzielle erniedrigte Proteinexpression der STAT1-supprimierten, stimulierten Ansätze beobachtet.

#### 4.6 STAT1-„Knockdown“ beeinflusst die Expression der „Depressionsgene“ negativ

Wie in Kapitel 4.2.1 beschrieben, sind die meisten der 15 IFN-induzierbaren „Depressionsgene“ nach 24 h-Kostimulation mit IFN und Poly(I:C) in hippocampalen und kortikalen Neuronen stark überexprimiert (Abbildung 4.7). STAT1 ist eines der 15 entdeckten „Depressionsgene“. Die Modulation der Genexpression von depressionsassoziierten Interferon-Antwortgenen durch mIFN- $\alpha$  und Poly(I:C) findet auf direktem (IFN-abhängige Phosphorylierung) oder indirektem Weg (verzögerte TLR3-abhängige Phosphorylierung) statt (Huang et al., 2006). In beiden Fällen ist daran die STAT1-Aktivierung beteiligt (Luu et al., 2014).

In diesem Teil der Arbeit wird der Einfluss des STAT1-„Knockdowns“ auf die Expression der IFN-induzierten „Depressionsgene“ untersucht. Die Expressionslevel der 14 depressionsassoziierten Interferon-Antwortgene wurden nach dem 24 h-STAT1-„Knockdown“ in hippocampalen und kortikalen Neuronen mittels qRT-PCR validiert (Kapitel 3.4.3). In diesem Experiment wurden Expressionswerte der 14 „Depressionsgene“ in unbehandelten Neurozellen, der mit unspezifischen, nicht-codogenen siRNA transfizierten Neurozellen (siNC-Kontrolle) und der STAT1-supprimierten Neurozellen gemessen. Alle Expressionswerte wurden gegen 1.000 Actb-Kopien normalisiert (Kapitel 3.4.2) und gegen die Expressionswerte des jeweiligen Gens von unbehandelten Neurozellen abgeglichen. Die „Depressionsgen“-Suppressionswerte wurden in Relation zu den jeweiligen Expressionswerten der „siNC-Kontrolle“ gesetzt und in Prozent in der Abbildung 4.14 dargestellt. In der Grafik ist eine „siNC-Kontrolle“ exemplarisch dargestellt. Das Hauptaugenmerk richtet sich auf die sechs „Depressionsgene“, die eng mit der Entstehung der endogenen/exogenen Depression in Verbindung gebracht werden (*Disc1*, *Dynl1*, *Gch1*, *Tor1b*, *Mef2a*, *St3gal5*) (Schlaak et al., 2012), (Abbildung 4.14, A).

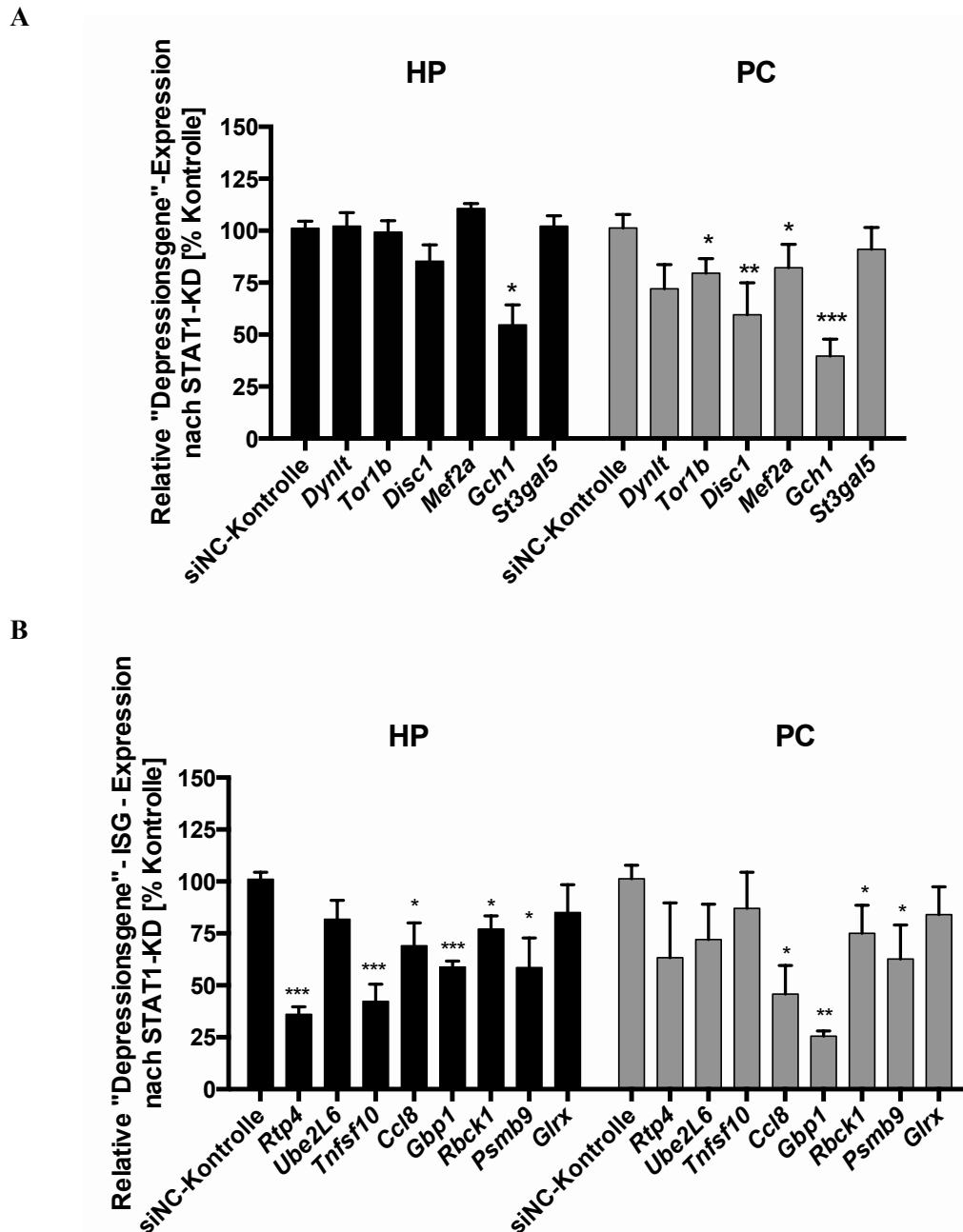


Abbildung 4.14: Expression der „Depressionsgene“ nach STAT1-Suppression in primären hippocampalen, HP und kortikalen Neuronen, PC. Die Expressionslevel der 14 „Depressionsgene“ wurden in STAT1-supprimierten Neuronen, in unbehandelten und in mit unspezifischen, nicht-codogenen siRNA (siNC-Kontrolle) transfizierten Zellen mittels quantitativer RT-PCR ermittelt und gegen 1.000 Actb Kopien normalisiert. Alle Werte wurden anschließend gegen die Expressionswerte des jeweiligen Gens von unbehandelten Zellen abgeglichen. Diese „Depressionsgen“-Expressionswerte der STAT1-supprimierten Zellen wurden in Relation zu den „Depressionsgen“-Expressionswerten der jeweiligen siNC-Kontrollen in Prozent dargestellt. (A) *Gch1* ist in beiden Geweben signifikant herunterreguliert. Im PC sind die Expressionslevel von *Tor1b*, *Disc1* und *Mef2a* gegenüber der siNC-Kontrolle signifikant erniedrigt. (B) Die klassischen ISGs, wie *Psmb9*, *Rbck1*, *Gbp1* und das Zytokinen *Ccl8* sind in beiden Geweben signifikant herunter reguliert. *Rtp4* und *Tnfsf10* sind nur im HP hoch signifikant erniedrigt. Die Daten sind als Mittelwerte ( $\pm$ SEM) dargestellt, die Signifikanz wird gegenüber dem zugehörigen siNC-Kontrollwert des jeweiligen Gens berechnet; \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; (n=3).

In Abbildung 4.14 ist die erniedrigte Expression von 14 „Depressionsgenen“ nach dem STAT1-„Knockdown“ dargestellt. Die Wirkung der STAT1-Suppression auf die Expression der „Depressi-

ongene“ in primären Gehirnzellen scheint gewebespezifisch zu sein. Auffällig ist, dass das Gen *Gch1* in beiden Geweben hoch signifikant erniedrigt exprimiert wird (Abbildung 4.14, A). *Tor1b*, *Disc1*, *Mef2a* zeigen signifikant erniedrigte Expressionslevel im PC (präfrontaler Kortex). Einen ähnlichen Trend zeigt *Disc1* aber auch im HP (Hippocampus). Die Induktion der meisten der sechs „Depressionsgene“ ist in kortikalen Neuronen durch STAT1-„Knockdown“ deutlich gehemmt. Die ISG, wie *Rbck1*, *Psmb9*, *Gbp1* und das Zytokinen *Ccl8* sind in beiden Geweben nach der STAT1-Suppression herunterreguliert. Im HP werden *Rtp4* und *Tnfsf10* hoch signifikant erniedrigt exprimiert (Abbildung 4.14, B). Die Expression der meisten ISGs scheint besonders in hippocampalen Neuronen durch den STAT1-„Knockdown“ signifikant erniedrigt zu sein. Alle anderen Gene zeigen einen Trend zur Herunterregulation.

Wie diese Ergebnisse zeigen, unterliegen die „Depressionsgene“ einem STAT1-abhängigen Regulationsmechanismus. Durch das gezielte Ausschalten der *Stat1*-Genexpression in murinen Neuronen sind diese „Depressionsgene“ in ihrer Expression signifikant erniedrigt. Die Expression bei vier der sechs wichtigen „Depressionsgene“ *Gch1*, *Disc1*, *Tor1b* und *Mef2a* ist besonders in kortikalen Neuronen niedrig. Im nächsten Kapitel wird die Stimulierbarkeit dieser vier „Depressionsgene“ in STAT1-supprimierten Neuronen *in vitro* untersucht.

#### 4.6.1 mIFN- $\alpha$ /Poly(I:C)-Stimulierbarkeit der „Depressionsgene“ in STAT1-supprimierten Neuronen

Die vier „Depressionsgene“ *Gch1*, *Tor1b*, *Mef2a* und *Disc1*, deren Expression der STAT1-„Knockdown“ negativ beeinflusst (Kapitel 4.6), sind eng mit der Entstehung der endogen/exogenen Depression in Verbindung gebracht. In diesem Teil der Arbeit wird die Induzierbarkeit dieser Gene nach mIFN- $\alpha$ /Poly(I:C)-Stimulation in STAT1-supprimierten Neuronen untersucht.

Hippocampale und kortikale Neuronen wurden nach dem STAT1-„Knockdown“ für weitere 24 h mit mIFN- $\alpha$  und Poly(I:C) stimuliert. Anschließend wurden die „Depressionsgen“-Expression mittels qRT-PCR validiert. Die Expressionswerte der „Depressionsgene“ unbehandelter Zellen, der STAT1-supprimierten Zellen, und die der transfizierten Zellen mit unspezifischer, nicht-codogener siRNA (siNC-Kontrolle) wurden gegen 1.000 Actb-Kopien normalisiert und gegen die jeweiligen Expressionswerte der unbehandelten Zellen abgeglichen. In Abbildung 4.15 sind die Expressionslevel der vier „Depressionsgene“ *Gch1*, *Disc1*, *Tor1b* und *Mef2a* in STAT1-supprimierten, hippocampalen und kortikalen Neuronen und ihre Induktion nach der anschließenden IFN/Poly(I:C)-Stimulation dargestellt. Die Signifikanz der Expressionswerte wird gegenüber den jeweiligen siNC-Werten berechnet. Die mit unspezifischer, nicht-codogener siRNA transfizierten Ansätze wurden ebenfalls stimuliert (siNC+mIF+IC, mIFN- $\alpha$ /Poly(I:C)-stimulierte siNC-Kontrolle), um die

Expressionswerte der „Depressionsgene“ mit den Werten der stimulierten siStat1-Ansätze (siStat1+mIF+IC, mIFN- $\alpha$ /Poly(I:C)-stimulierter siStat1-Ansatz) zu vergleichen.

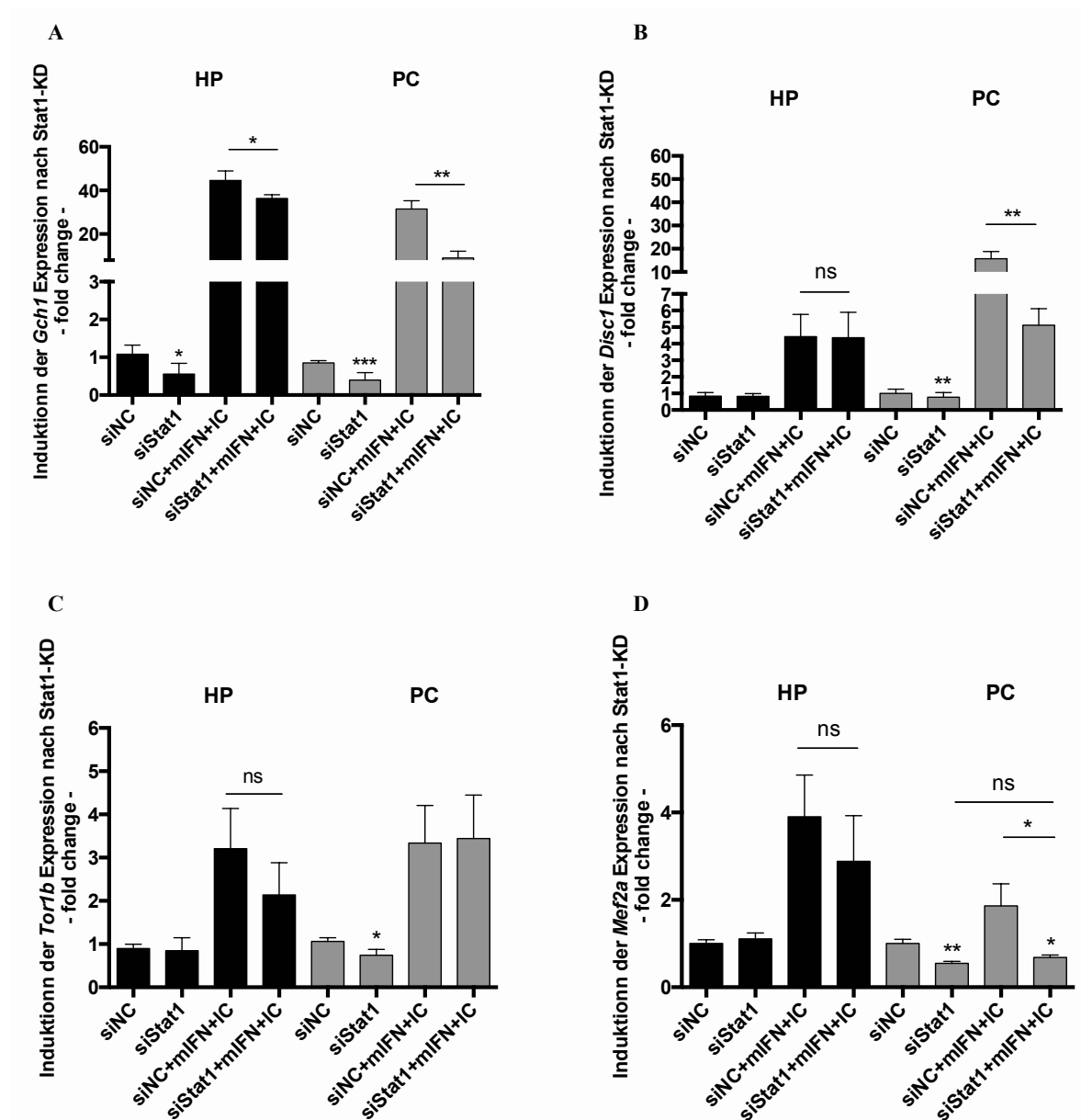


Abbildung 4.15: mIFN- $\alpha$ /Poly(I:C)-vermittelte Induktion der „Depressionsgene“-Expression in STAT1-supprimierten Neuronen. Hippocampale, HP und kortikale Neuronen, PC, wurden nach dem STAT1-„Knockdown“-Experiment für weitere 24 h mit mIFN- $\alpha$  1000 IU (mIF) und Poly(I:C) 100  $\mu$ g/ml (IC) stimuliert. (A, B) Die *Gch1*-Expressionslevel der stimulierten siStat1-Ansätze (siStat1+mIF+IC) sind im Vergleich zum *Gch1*-Expressionslevel der stimulierten siNC-Kontrolle (siNC+mIF+IC) in beiden Geweben signifikant erniedrigt. Ähnlich verhält sich die *Disc1*-Expression nur im PC. (C) *Tor1b*-Expression ist nur in kortikalen siStat1-Neuronen signifikant erniedrigt. Es ist kein Unterschied zwischen stimulierter siNC-Kontrolle und der stimulierten siStat1-Ansätzen im PC feststellbar. (D) Die *Mef2a*-Expression lässt sich in kortikalen siStat1-Neuronen durch mIFN- $\alpha$ /Poly(I:C)-Kostimulation nicht induzieren. Sie ist im Vergleich zur stimulierten siNC-Kontrolle signifikant erniedrigt. Die Genexpression wurde mittels quantitativer RT-PCR ermittelt, gegen 1.000 Actb Kopien normalisiert und gegen die jeweiligen Expressionswerte der unbehandelten Zellen abgeglichen. Die Daten sind als Mittelwerte ( $\pm$ SEM) dargestellt. Die Signifikanz aller Werte wird gegenüber ihrem zugehörigen siNC-Wert berechnet; \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; (n=3).

In Abbildung 4.15 sind die Expressionslevel der „Depressionsgene“ *Gch1*, *Disc1*, *Tor1b* und *Mef2a* in siStat1-Neuronen (siStat1+mIF+IC) und unbehandelt und nach der IFN/Poly(I:C)-Stimulation im Vergleich zur stimulierten siNC-Kontrolle (siNC+mIFN+IC) dargestellt. Die Genexpression von *Gch1*, *Disc1* und *Tor1b* lässt sich durch IFN/Poly(I:C)-Stimulation gewebespezifisch induzieren. Die *Gch1*-Expression ist in stimulierten siStat1-Ansätzen (siStat1+mIF+IC) gegenüber der stimulierten siNC-Kontrolle in beiden Geweben signifikant erniedrigt (Abbildung 4.15, A). Ähnlich verhält sich die *Disc1*-Expression nur im PC (präfrontaler Kortex) (Abbildung 4.15, B). Es wird keine signifikante Veränderung im *Tor1b*- und *Mef2a*-Expressionslevel zwischen stimulierter siNC-Kontrolle und stimulierten siStat1-Ansätzen in HP (Hippocampus) beobachtet. Nichtsdestotrotz ist ein absteigender Trend der *Tor1b*- und *Mef2a*- Expression in stimulierten siStat1-Ansätzen zu sehen (Abbildung 4.15, C, D). Besonders auffällig ist die *Mef2a*-Expression in stimulierten siStat1-Ansätzen im PC, die sich durch mIFN- $\alpha$ /Poly(I:C)-Stimulation nicht induzieren lässt und dabei keine Signifikanz zu den Expressionswerten der nicht-stimulierten siStat1-Ansätze zeigt (Abbildung 4.15, D).

Anhand dieser Ergebnisse wird ersichtlich, dass die Sensitivität der „Depressionsgene“ gegenüber exogener oder endogener Typ-I-IFNe mittels STAT1-Suppression hauptsächlich in kortikalen Neuronen signifikant herabgesenkt werden kann. Im Fall der Gens *Mef2a* war die STAT1-Suppression in kortikalen Neuronen so effizient, dass auch eine IFN/Poly(I:C)-Kostimulation nahezu keine Erhöhung der *Mef2a*-mRNA induzieren konnte.

#### 4.7 Die STAT1-Suppression beeinflusst die Expression von proinflammatorischen Zytokinen

Interferone sind starke Immunmodulatoren und können eine Reihe anderer Zytokine und Chemokine induzieren. Proinflammatorische Zytokine scheinen an der Genese von Depressionen direkt oder indirekt beteiligt zu sein. Welche Wirkung die neuronale STAT1-Suppression auf die Expression von proinflammatorischen Zytokinen haben kann, wird in diesem Kapitel beschrieben. Ebenso wird die IFN- $\alpha$ /Poly(I:C)-Stimulierbarkeit der Zytokinproduktion in STAT1-supprimierten Neuronen untersucht.

Bereits im Kapitel 4.3 wurden erhöhte Expressionslevel der proinflammatorischen und antiviralen Zytokine (*Cxcl10*, *Ccl5*, *Il6*, *Ifng* und *Tnf*) durch IFN- $\alpha$ /Poly(I:C)-Kostimulation festgestellt. Die Expressionslevel dieser IFN/Poly(I:C)-sensitiven Zytokine wurden auch nach einem STAT1-„Knockdown“ in hippocampalen und kortikalen Zellen *in vitro* untersucht.

In Abbildung 4.16 sind die mRNA-Expressionslevel von proinflammatorischen Zytokinen nach dem STAT1-„Knockdown“ dargestellt. In diesem Experiment wurden Zytokin-Expressionswerte der unbehandelten Neurozellen, der mit unspezifischen, nicht-codogenen siRNA transfizierten

Neurozellen (siNC-Kontrolle) und der STAT1-supprimierten Neurozellen gemessen. Alle Expressionswerte wurden gegen 1.000 Actb-Kopien normalisiert (Kapitel 3.4.2) und gegen die Expressionswerte des jeweiligen Gens von unbehandelten Neurozellen abgeglichen. Die Zytokin-Suppressionswerte wurden in Relation zu den jeweiligen Expressionswerten der „siNC-Kontrolle“ gesetzt und in der Abbildung 4.16 dargestellt.

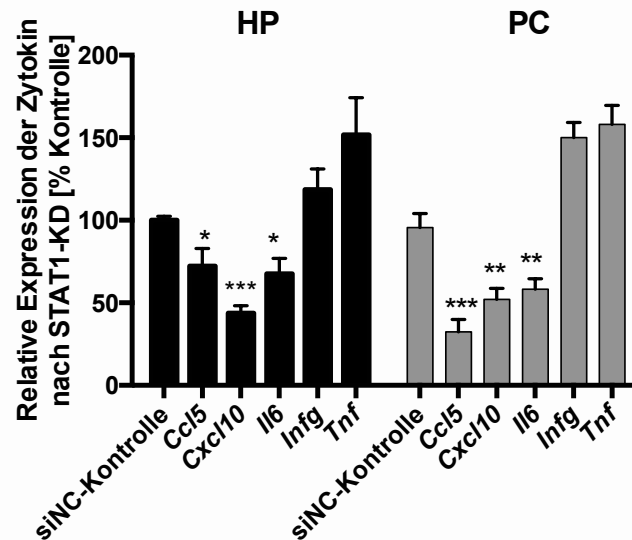


Abbildung 4.16: Supprimierte Expressionslevel von proinflammatorischen und antiviralen Zytokinen nach einem STAT1-„Knockdown“. In STAT1-supprimierten hippocampalen und kortikalen Neuronen wurden die Zytokin-Expressionslevel in STAT1-supprimierten Neuronen, in unbehandelten und in mit unspezifischen, nicht-codogenen siRNA (siNC-Kontrolle) transfizierten Zellen mittels quantitativer RT-PCR ermittelt und gegen 1.000 Actb Kopien normalisiert. Alle Werte wurden anschließend gegen die Expressionswerte des jeweiligen Gens von unbehandelten Zellen abgeglichen. Diese „Depressionsgen“-Expressionswerte der STAT1-supprimierten Zellen wurden in Relation zu den „Depressionsgen“-Expressionswerten der jeweiligen siNC-Kontrollen in Prozent dargestellt. *Ccl5*, *Cxcl10*, *Il6* zeigen eine signifikant erniedrigte Expression in beiden Hirnarealen. Die *Ifng*- und *Tnf*-Expressionslevel sind überexprimiert. Die Daten sind als Mittelwerte ( $\pm$ SEM) dargestellt, die Signifikanz aller Werte wird gegenüber ihrem zugehörigen siNC-Wert berechnet; \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; (n=3).

In der Abbildung 4.16 sind supprimierte Expressionslevel von *Ccl5*, *Cxcl10* und *Il6* im Vergleich zu den zugehörigen siNC-Kontrollen nach STAT1-Suppression in beiden Geweben zu sehen. Im Gegensatz dazu sind *Ifng* und *Tnf* in beiden untersuchten Hirnarealen überexprimiert.

STAT1-supprimierte Neuronen wurden anschließend mit mIFN- $\alpha$ /Poly(I:C) für 24 h stimuliert, um die Sensibilität der Zytokinexpression gegenüber mIFN- $\alpha$ /Poly(I:C) in STAT1-supprimierten Neuronen zu überprüfen. In diesem Experiment wurden Expressionswerte der Chemokine *Ccl5*, *Cxcl10* und *Il6* von unbehandelten Zellen, von STAT1-supprimierten Zellen, und von transfizierten Zellen mit unspezifischer, nicht-codogener siRNA (siNC-Kontrolle) gegen 1.000 Actb-Kopien normalisiert. Die ermittelten Werte wurden gegen die jeweiligen Expressionswerte der unbehandelten Zellen abgeglichen. Um die Zytokin-Expressionswerte der stimulierten siStat1-Ansätze (siStat1+mIF+IC) vergleichen zu können, wurden die siNC-Kontroll-Ansätze ebenfalls mit mIFN-

$\alpha$ /Poly(I:C) stimuliert (stimulierte siNC-Kontrolle, siNC+mIFN+IC). Die Signifikanz der Expressionswerte wird gegenüber den jeweiligen siNC-Kontrollwerten berechnet. Die Werte von *Ifng* und *Tnf* wurden nicht dargestellt, da sie keine signifikante Minderung im mRNA-Expressionslevel in STAT1-supprimierten Neuronen gezeigt haben (Abbildung 4.17).

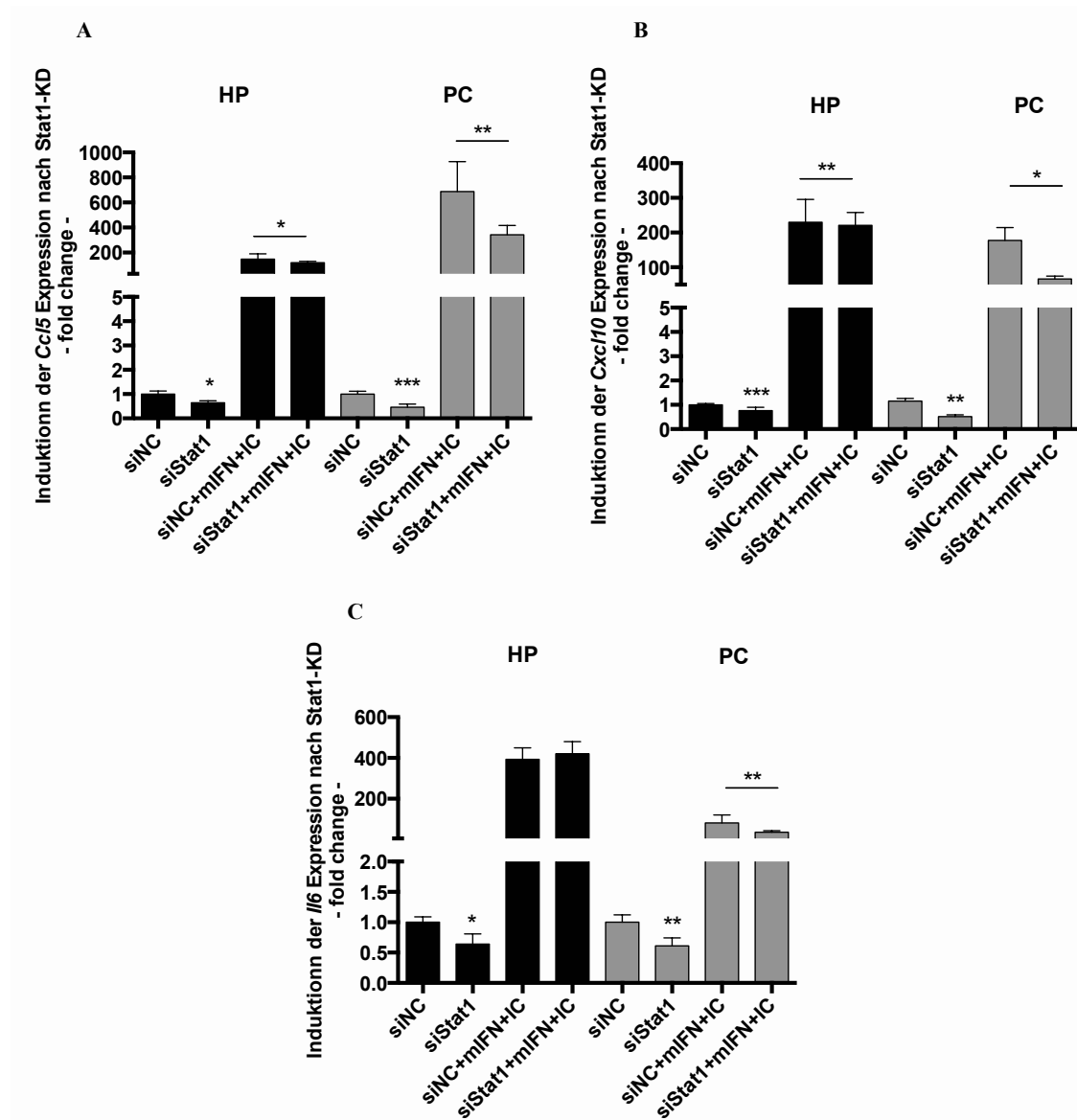


Abbildung 4.17: mIFN- $\alpha$ /Poly(I:C)-vermittelte Induktion der Expression der proinflammatorischen Zytokin-Expression in STAT1-supprimierten hippocampalen und kortikalen Neuronen (HP/PC). (A, B) Die Expressionslevel der proinflammatorischen Zytokine *Ccl5* und *Cxcl10* in stimulierten siStat1-Neuronen sind in beiden Geweben gegenüber der stimulierten siNC-Kontrolle (siNC+IFN+IC) signifikant erniedrigt. (C) *Il6* zeigt eine signifikante Herabsenkung der Expression gegenüber der stimulierten siNC-Kontrolle nur im PC. Die mRNA-Expressionslevel wurden mittels qRT-PCR validiert. Die Werte wurden gegen 1.000 Actb Kopien normalisiert und gegen die Expressionswerte der unbehandelten Proben abgeglichen. Die Daten sind als Mittelwerte ( $\pm$ SEM) dargestellt, die Signifikanz aller Werte wird gegenüber ihren zugehörigen siNC-Werten berechnet; \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; (n=3).

Die Ergebnisse zeigen, dass die Zytokin-Genexpression *Ccl5*, *Cxcl10* und *Il6* nach dem STAT1-„Knockdown“ und der IFN/Poly(I:C)-Kostimulation für 24 h stimulierbar bleibt. Die Expressions-

level von *Ccl5* und *Cxcl10* der stimulierten siStat1-Ansätze (siStat1+mIF+IC) sind gegenüber der stimulierten siNC-Kontrolle (siNC+mIFN+IC) in beiden Geweben signifikant erniedrigt (Abbildung 4.17, A, B). Für *Il6* konnte im Vergleich zum stimulierten siNC-Kontroll-Ansatz eine signifikante Minderung der Expressionslevel der stimulierten siStat1-Ansätze nur im PC (präfrontaler Kortex) gezeigt werden (Abbildung 4.17, C). Somit ist die Expression von proinflammatorischen Zytokinen in STAT1-supprimierten Neuronen stimulierbar, wird jedoch durch STAT1-Suppression im Vergleich zur stimulierten siNC-Kontrolle signifikant herabgesenkt.

#### 4.8 Die STAT1-Suppression steuert die Aktivität des serotonergen Systems

Proinflammatorische Zytokine wie IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und TNF beeinflussen direkt den 5-HT-Metabolismus und durch Stimulation des Enzyms Indolamin-2,3-Dioxygenase mit konsekutiver Tryptophan-Depletion auch indirekt das noradrenerge System. Zudem sind IL6 und TNF potente Stimulatoren der HHN-Achse (Schaefer M. and Schwaiger M., 2003). Die Kausalität dieser Zusammenhänge wird in der Expression der Effektormoleküle des serotonergen Systems, wie des Serotoninrezeptors/-transporters, des tryptophanabbauenden Enzyms Indolamin-2,3-Dioxygenase, in STAT1-supprimierten hippocampalen und kortikalen Neuronen im Weiteren untersucht.

Viele Aspekte des 5-HT-Systems, einschließlich der Änderung des 5-HT-Umsatzes und der Rezeptor-/Transporterbindungen, sind bei schweren Depressionen verändert. Die Aktivität der Effektormoleküle des 5-HT-Systems und auch die des dopaminergen Systems wurden gegenüber der IFN/Poly(I:C)-Stimulation in dieser Arbeit bereits molekularbiologisch untersucht (Kapitel 4.4). Diese *in vitro*-Ergebnisse deuten auf einen erhöhten Neurotransmitter-Metabolismus hin (Abbildung 4.10). Ob der STAT1-„Knockdown“ einen Einfluss auf die Expression des Serotoninrezeptors (5HT1A-Rezeptor, *Htr1a*), des Serotonintransporters (*Slc6a4*) und der Indolamin-2,3-Dioxygenase (*Ido1*) hat, wird in diesem Kapitel untersucht. Anschließend wird die Sensibilität dieser Gene gegenüber mIFN- $\alpha$ /Poly(I:C)-Kostimulation für 24 h nach dem STAT1-„Knockdown“ in hippocampalen und kortikalen Neuronen mittels qRT-PCR nachgewiesen (Kapitel 3.3.2). Dabei wurden die Expressionswerte der unbehandelten Neuronen, der STAT1-supprimierten Neuronen und der mit unspezifischer, nicht-codogener siRNA transfizierten Neuronen (siNC-Kontrolle) ermittelt und gegen 1.000 Actb-Kopien normalisiert. Diese Werte wurden anschließend gegen die jeweiligen Expressionswerte der unbehandelten Neuronen abgeglichen. Um die Expressionswerte der stimulierten siStat1-Ansätze (siStat1+mIF+IC) mit Ausgangswerten vergleichen zu können, wurden die siNC-Kontroll-Ansätze ebenfalls mit mIFN- $\alpha$ /Poly(I:C) stimuliert (stimulierte siNC-Kontrolle, siNC+mIF+IC). Die Signifikanz der Expressionswerte wird gegenüber den jeweiligen siNC-Kontrollwerten berechnet (Abbildung 4.18).



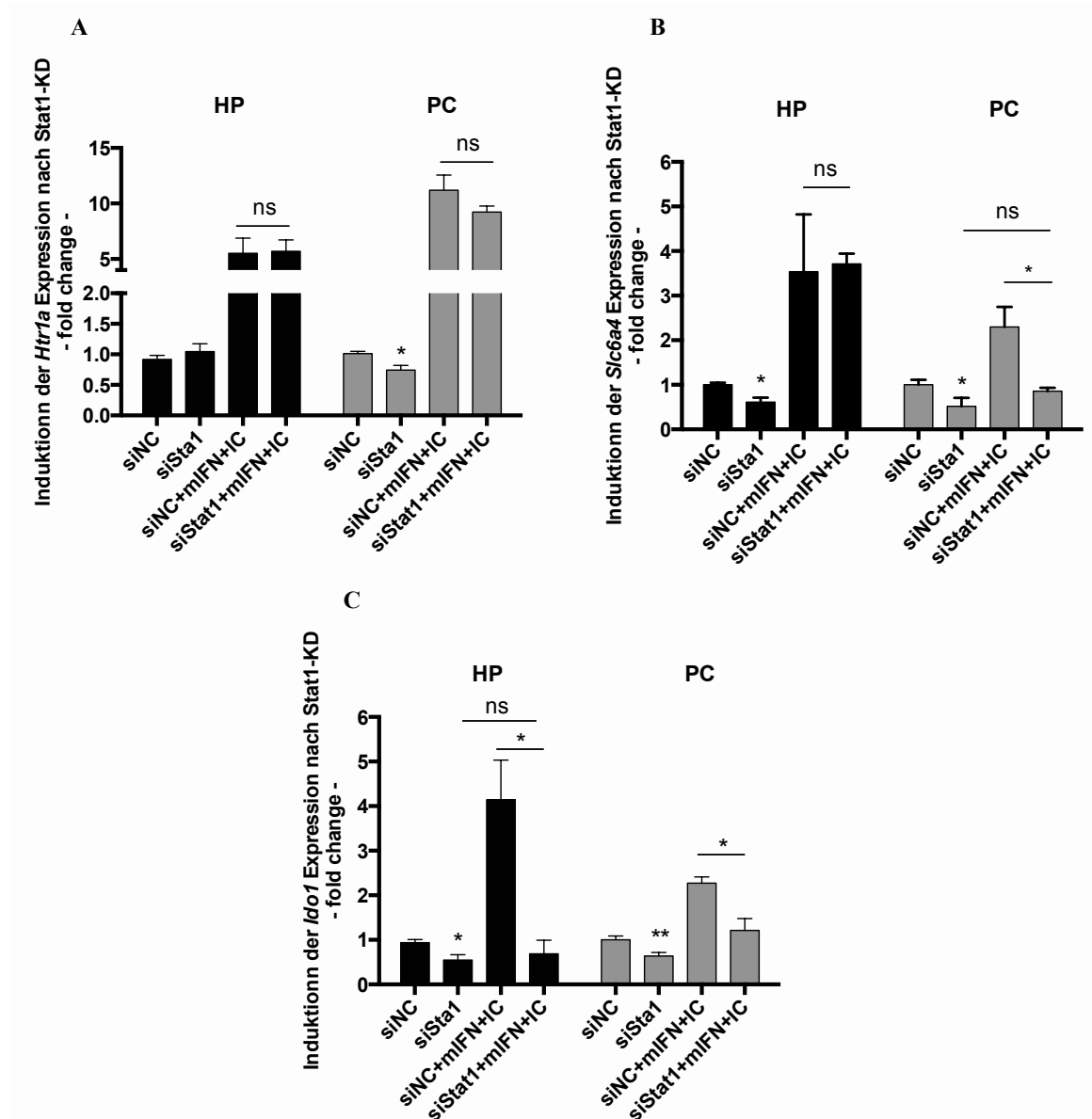


Abbildung 4.18: Verminderte mIFN- $\alpha$ /Poly(I:C)-Induktion der Effektormoleküle des serotonergen Systems in STAT1-supprimierten hippocampalen und kortikalen Neuronen (HP/PC). (A) Die Expression des Serotoninrezeptors (*Htr1a*) ist im Vergleich zu siNC-Kontrolle nur in kortikalen Neuronen signifikant erniedrigt. Die *Htr1a*-Expression der stimulierten STAT1-Ansätze zeigt im Vergleich zur stimulierten siNC-Kontrolle (siNC+mIFN+IC) einen abnehmenden Trend. (B) Die Expressionslevel des Serotonintransporters (*Slc6a4*) sind in supprimierten Neuronen beider Hirnareale signifikant erniedrigt. Die Induktion des *Slc6a4*-Expression der stimulierten siStat1-Ansätze bleibt im Vergleich zu stimulierten siNC-Kontrolle nur im PC signifikant gehemmt. (C) Die Expression des Enzyms *Idol* wird durch die STAT1-Suppression in beiden Geweben signifikant erniedrigt. Im HP wird die Stimulierbarkeit der *Idol*-Expression trotz Kostimulation gehemmt. Im PC bleibt die *Idol*-Expression trotz Kostimulation gegenüber der stimulierten siNC-Kontrolle signifikant erniedrigt. Die Genexpressionsanalyse wurde mittels qRT-PCR durchgeführt. Die Werte wurden gegen 1.000 Actb Kopien normalisiert und gegen die Expressionswerte der jeweiligen unbehandelten Proben abgeglichen. Die Daten sind als Mittelwerte ( $\pm$ SEM) dargestellt, die Signifikanz aller Werte wird gegenüber den zugehörigen siNC-Werten berechnet; \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; (n=3).

Die Abbildung 4.18, A zeigt, dass die *Htr1a*-Expression nur in kortikalen Neuronen durch STAT1-Suppression signifikant erniedrigt bleibt. Der STAT1-„Knockdown“ hat im Vergleich zur unspezifischen siNC-Kontrolle keinen Einfluss auf die 5-fache (in hippocampalen Neuronen) bzw. 10-

fache (in kortikalen Neuronen) Stimulierbarkeit durch die IFN/Poly(I:C)-Kostimulation. Die Expression des Serotonintransporters (*Slc6a4*) ist sowohl in siStat1-supprimierten, hippocampalen als auch in kortikalen Neuronen signifikant erniedrigt. Im Vergleich zu stimulierten siNC-Kontrolle (siNC+mIF+IC) im PC (präfrontaler Kortex) wird keine Induktion der *Slc6a4*-Expression in stimulierten siStat1-Ansätzen beobachtet (Abbildung 4.18, B). Die *Idol*-Expressionslevel sind in beiden Geweben im Vergleich zur siNC-Kontrolle signifikant erniedrigt. Die Stimulierbarkeit der *Idol*-Expression durch Kostimulation wird durch den STAT1-„Knockdown“ besonders in hippocampalen Neuronen komplett unterbunden (Abbildung 4.18, C).

Die oben aufgeführten Ergebnisse deuten auf eine Einflussnahme des STAT1-Moleküls auf die Expression der Effektormoleküle des serotonergen Systems hin. Besonders die Expression des tryptophan-katalysierenden Enzyms Indolamin-2,3-Dioxygenase und des Serotonintransporters hängen gewebespezifisch von der STAT1-Suppression ab. Durch die posttranskriptionelle Suppression des IFN-Antwortgens konnte eine Reduktion der Aktivität der wichtigen Effektormoleküle des serotonergen Systems gezeigt werden.

## 5 Diskussion

Die Depression ist eine heterogene Erkrankung, deren Ursache in einigen Fällen mit einer Entzündung oder einer Langzeitbehandlung der Patienten mit Zytokinen, wie Interferonen assoziiert ist. Die pathophysiologischen Mechanismen der depressiven Zustände sind nicht ganz geklärt. Bei Verabreichung von IFN als Therapeutikum bei chronischen Virusinfektionen oder Tumorerkrankungen – welche *per se* mit einer Entzündung assoziiert sind – induziert IFN einen depressiven Phänotyp mit einem hohen Grad der Entzündung. Die IFN-induzierte Depression stellt ein eigenes Krankheitsbild dar, das durch bestimmte Zytokine, zelluläre Signalwege und Neurotransmittersysteme hervorgerufen wird. Es ist bekannt, dass HCV die Produktion von Typ-I-IFN durch Aktivierung des Toll-like-Rezeptorsystems aktivieren kann, was in der Studie von Schlaak und Mitarbeitern bestätigt wurde (Schlaak et al., 2012). Darauf basierend wurde die Hypothese aufgestellt, dass die erhöhte endogene IFN-Produktion die oft beobachteten depressiven und kognitiven Störungen bei HCV-Patienten teilweise erklären könnte. Um die Risiken der schweren Nebenwirkungen, wie endogene und/oder IFN-vermittelte Depression zu mildern oder zu vermeiden, wurde in dieser Studie neben dem signifikant erhöhten basalen Expressionslevel von Typ-I- und Typ-II-IFN im Blut der Patienten mit schweren depressiven Episoden, eine selektive Überexpression von 15 depressionsassoziierten Genen – im folgenden „Depressionsgene“ genannt – validiert: 1) im Blut von HCV-Patienten, die unter IFN-Therapie eine Depression entwickelt haben, 2) im Blut von Patienten mit schweren depressiven Episoden, 3) In Gehirngeweben von Personen, die Suizid begangen hatten (C. Hoyo-Becerra, Huebener, A., et al., 2013; Schlaak et al., 2012). Sechs dieser Gene *DISC1*, *GCHI*, *DYNLT1*, *MEF2A*, *TOR1B* und *ST3GAL5* wurden bereits mit schweren Depressionen bzw. neuronalen Entwicklungsvorgängen im Gehirn als relevant beschrieben (Tabelle 1.1), (zusammengefasst in Schlaak et al., 2012). *DISC1*, „disrupted in schizophrenia 1“ spielt eine Rolle bei Neuritenwachstum und kortikalen Entwicklungen und trägt zu Veränderungen der hippocampalen Struktur und Funktion bei. Darüber hinaus wird *DISC1* mit Schizophrenie, unipolaren und bipolaren affektiven Störungen und Depressionen assoziiert, also den Erkrankungen die von morphologischen Hirnhauptstrukturveränderungen durch Reduktion der grauen Substanz im präfrontalen Kortex, Hippocampus und Striatum gekennzeichnet sind. *GCHI* kodiert das Tetrahydrobiopterin(BH<sub>4</sub>)-Biosynthese-Enzym, die geschwindigkeitsbestimmende Guanosintriphosphat-Cyclohydrolase I. BH<sub>4</sub> ist auch ein wesentlicher Cofaktor der Tryptophan- und Tyrosin-Hydroxylase und der NO-Synthase, die für die Dopamin- und Serotonin-Biosynthese erforderlich sind (zusammengefasst in Schlaak et al., 2012). *DYNLT1* spielt eine Schlüsselrolle in mehreren Stufen bei der hippocampalen Neuronenentwicklung sowie bei Neuritenaussprossung, Axon-Spezifikation und dendritischen Ausdifferenzierungen. *MEF2A* ist an der neuronalen und postsynaptischen Differenzierung beteiligt und trägt zur Hemmung des Neuritenwachstums bei. *TOR1B* zeigt eine Immunoreaktivität in allen Bereichen des Hippocampus. Dieses Gen (homolog zu

*TOR1A*) wird mit dem frühen Auftreten einer wiederkehrenden schweren Depression in Verbindung gesetzt und ist an der Regulation der Dopaminfreisetzung beteiligt. Schließlich wird *ST3GAL5* eine Beteiligung bei der neuronalen Apoptose in der murinen hippocampalen Zelllinie zugeschrieben (zusammengefasst in Schlaak et al., 2012). Diese selektive Hypersensibilität der Gene gegenüber der exogenen (IFN-Therapie) oder des endogenen Typ-I-IFN (depressive Störung) kann zur Entwicklung depressiver Symptome beitragen.

### 5.1 IFN-vermittelte Hypersensitivität der „Depressionsgene“ in hippocampaler und kortikaler Zellkultur als möglicher Marker für eine bevorstehende Depression

Mit dem Ziel die Bedeutung und die Rolle der depressionsassoziierten Gene im Gehirn detaillierter zu untersuchen, wird als erstes die Stimulierbarkeit der Gene gegenüber exogenem mIFN- $\alpha$  in murinen hippocampalen Zellen der Zelllinie HT22 analysiert. Nach der Dosisfindung für die IFN-Stimulation wird eine selektive Überexpression der 13 Kandidatengene in HT22 nachgewiesen. Dabei ist die Expression der ISGs - *Rtp4*, *Ube2L6*, *Gbp1*, *Tnfrsf10* und *Stat1* - signifikant erhöht. Die restlichen „Depressionsgene“ sind schwach hochreguliert. Es wird kein signifikanter Unterschied in der Expression von *St3gal5* und *Mef2a* beobachtet. Diese Ergebnisse stimmen teilweise mit den Ergebnissen der selektiven Hypersensibilität der „Depressionsgene“ im peripheren Blut der HCV-Infizierten, die mit IFN therapiert wurden, überein. Ebenso mit denen im Blut von Patienten, die unter schweren depressiven Episoden litten, sowie im Gehirngewebe von Personen, die einen Suizid begangen hatten (Schlaak et al., 2012). Die HT22 Zellen sind transformierte Zellen und zeigen ihr unbegrenztes Teilungspotenzial, in dem sie die Seneszenz umgehen. Sie ermöglichen somit auch zeitlich ausgedehnte Studien, was unter dem Aspekt der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse das ausschlaggebende Argument für den Einsatz permanenter Zellkulturen ist. Ein entscheidender Nachteil ist jedoch, dass sie nur noch wenige ihrer ursprünglichen *in vivo*-Charakteristika besitzen (Schmitz, 2011). Dies könnte der Grund für unterschiedliche Expressionsmuster der „Depressionsgene“ sein.

Um diese Vorgänge unter *in vivo*-ähnlichen Bedingungen besser untersuchen zu können, wird ein neuronales Zellkultur-System aus primären, murinen Gehirnzellen entwickelt, das die Bedingungen der chronischen HCV-Infektion unter IFN-Therapie nachahmt. Die Bedingungen könnten in manchen Aspekten den Zuständen der Patienten mit idiopathischer Depression oder suizidgefährdeten Individuen ähneln. Primärzellen sind Zellkulturen, die sich am wenigsten verändern und deshalb den Bedingungen im Organismus am nächsten kommen. Die Herstellung primärer Zellkultur ist arbeits- und zeitaufwendig, da das Zellmaterial besonders bei embryonalen Hirngeweben der C57BL/6-Mäuse (Embryonaltag 17-18 (E 17-18)) sehr begrenzt ist. Nach der Isolierung des Hippocampus und des präfrontalen Kortexgewebes erhält man eine heterogene Zellpopulation, die

durch mehrere Aufreinigungsschritte (Gewebeextraktion, enzymatischer Gewebeerddau) zur neuronalen Zellkultur im Differenzierungsmedium - speziell für pränatale und embryonale hippocampale und kortikale Neuronen - in acht Tagen ausdifferenziert wird. Um die Bedingungen der viralen HCV-Infektion und einer gleichzeitigen IFN-Therapie *in vitro* zu simulieren, werden die Gehirnzellen mit Poly(I:C) und mIFN- $\alpha$  stimuliert und nach 24 h wurde die Aktivierung der „Depressionsgene“ nachgewiesen. *Tor1b* zeigt im Vergleich zu den sechs „Depressionsgenen“ eine signifikant erhöhte Expression während der Kostimulation in hippocampalen Neuronen (Abbildung 4.7). Eine stark erhöhte Expression von *Disc1*, *Gch1*, *Dynl1* und *Mef2a* nach 24 h kann besonders durch Kostimulation nachgewiesen werden. Dies deutet auf eine Hypersensitivität der Gehirnzellen auf mIFN- $\alpha$ /Poly(I:C) hin, die somit eine mögliche Entwicklung einer exogenen/endogenen Depression begünstigen kann. *St3gal5* zeigt eine starke Geninduktion in neuronaler Zellkultur während der mIFN- $\alpha$ -Monostimulation, während der Kostimulation jedoch eine Suppression sowohl in hippocampalen als auch in kortikalen Zellen nach 24 h. Die Tatsache, dass manche Gene, wie *St3gal5*, unter Monostimulation, nicht jedoch unter der Kostimulation stark aktiviert werden, suggeriert, dass einige Faktoren für die *in vivo*-Charakteristik in der Zellkultur fehlen, die diese Genexpression beeinflussen könnten.

Weitere untersuchte „Depressionsgene“ wie *Stat1*, *Ube2L6*, *Rtp4*, *Gbp1* sind ISGs. *Stat1* kodiert einen zentralen Vermittler des Typ-I- und -II-IFN-Signalweges, der die Zellapoptose fördert sowie das neuronale Überleben beeinträchtigt und somit zur Zytokin-vermittelten Neurotoxizität beiträgt. Außerdem dereguliert *Stat1* das Neurotransmittersystem, insbesondere 5-HT, Dopamin und Glutamat, welche in die Pathogenese von schweren depressiven Störungen involviert sind (Miller, 2009). *Ube2L6* kodiert die Mitglieder des Ubiquitin-Proteasomen-Systems, die durch die IFN- $\alpha$ 2-vermittelte STAT1-Aktivierung induziert werden. *Rtp4* kodiert für Rezeptor Transporter Protein 4 und spielt eine Rolle in antiviraler Immunantwort. *Gbp1* kodiert einen intrazellulären Regulator der Proliferation und Migration von Endothelzellen als Reaktion auf proinflammatorische Zytokine, die im Serum von Patienten mit chronischen Entzündungserkrankungen detektiert wurden (zusammengefasst in (C. Hoyo-Becerra et al., 2015)). Diese IFN-induzierbaren „Depressionsgene“ werden in dieser Arbeit nach 24 h der mIFN- $\alpha$ /Poly(I:C)-Kostimulation in neuronaler Zellkultur nicht nur signifikant hochreguliert, sondern sogar höher als alle andere „Depressionsgene“. Interessanterweise wurden diese Gene auch in der hippocampalen HT22 Zelllinie nach einer mIFN- $\alpha$ -Stimulation 24 h in dieser Arbeit signifikant erhöht nachgewiesen. Die schnelle Regulation dieser Interferon-induzierbaren Gene lässt vermuten, dass sie ein nützlicher Marker für eine bevorstehende Depression sind. Die Studie von Hoyo-Becerra und Mitarbeitern an Mäusen unterstützt diese These, in dem sie eine maximale Überexpression von *Stat1*, *Gbp1*, *Psm9*, *Ube2L6* und *Rtp4* nach mIFN- $\alpha$ /Poly(I:C)-Kostimulation *in vivo* zeigten. Interessanterweise fand die maximale Überexpression von *Stat1*, *Gbp1*, *Psm9*, *Ube2L6* und *Rtp4* früher (bereits nach 24 h) als die Zyto-

kin/Chemokin-Expression (nach 14 Tagen) im murinen hippocampalen und kortikalen Gewebe *in vivo* statt (C. Hoyo-Becerra et al., 2015). Diese ISGs scheinen einen gemeinsamen Aktivierungsmechanismus zu haben, denn sie sind sowohl *in vitro* (diese Arbeit: In der hippocampalen Zelllinie HT22 und in primären hippocampalen und kortikalen Neuronen, Kapitel 4.1 und 4.2.1) als auch *in vivo* (Studie von C. Hoyo-Becerra et al., 2015) stark überexprimiert.

## 5.2 IFN-vermittelte Induktion der proinflammatorischen Zytokine führt zur Dysregulation der Neurotransmitter-Biosynthese

IFN ist ein potenter Stimulus proinflammatorischer Zytokine, wie IL1, IL6, TNF und IFN- $\gamma$ , sowie des IFN- $\gamma$ -vermittelten Chemokins CXCL10 (IP-10), welche oft mit Depression assoziiert werden (Miller et al., 2009; Raison et al., 2006). Erhöhte Expressionslevel von IL6, TNF und CXCL10 wurden bereits im Blut von HCV-Patienten, die unter der IFN-Therapie eine Depression entwickelt haben, sowie im Blut von Patienten mit schweren depressiven Episoden und in Gehirngeweben von Personen, die Suizid begangen hatten, vorgefunden (C. Hoyo-Becerra, Huebener, A., et al., 2013; Schlaak et al., 2012). Auch die Arbeiten von Wichers et al. zeigten, dass IFN- $\alpha$  die Serumkonzentration von IL6, TNF und IFN- $\gamma$  im selben Ausmaß erhöht, wie die natürlich vorkommende Konzentration dieser Zytokine in depressiven neuropsychiatrischen Patienten (Wichers et al., 2007). Ebenso häufen sich Hinweise über das Vorhandensein eines chronischen proinflammatorischen Zustandes in depressionsbedingten Erkrankungen durch die Fähigkeit von Neuronen Typ-I-IFN und Zytokine zu produzieren, freizusetzen und darauf zu antworten (Wang & Campbell, 2005). In dieser Arbeit werden die relevanten Zytokine auf molekularer und proteinbiochemischer Ebene in primärer hippocampaler und kortikaler Neuro-Zellkultur *in vitro* untersucht. Eine erhöhte Expression von *Ccl5* (CCL5), *Il6* (IL6), *Cxcl1* (CXCL1), *Cxcl10* (CXCL10), *Tnf* (TNF), und *Ifng* (IFN- $\gamma$ ) wurde nach 24 h mIFN- $\alpha$ /Poly(I:C)-Kostimulation nachgewiesen. Dieses Ergebnis deutet auf eine synergetische Wirkung beider Stimulantien hin, wodurch die Zytokin/Chemokin-Produktion und ihre frühe Freisetzung als Folge der Aktivierung der Signalwege, die durch IFN-Rezeptor und TLR3-Rezeptor in Neuronen erfolgt. CCL5 und IL6 werden hauptsächlich während einer Immuninteraktion mit einem Pathogen und als Antwort von Geweben und Leukozyten auf entzündliche Zytokine (TNF, IFN- $\gamma$ ) freigesetzt (zusammengefasst in Oglodek et al., 2014). In der Studie von Oglodek und Kollegen wurde eine stark erhöhte Plasmakonzentration von CCL5 in männlichen und weiblichen Patienten mit unterschiedlichen Arten der Depression gefunden. Oglodek et al. vermutet CCL5 als wahrscheinlichen Früherkennungsmarker für die Entwicklung einer Depression (Oglodek et al., 2014). Ein stark erhöhtes Expressionsniveau von *Ccl5* (CCL5) wird auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt, indem auf molekularer und proteinbiochemischer Ebene das Vielfache der Expression der untersuchten Zytokine/Chemokine nach mIFN- $\alpha$ /Poly(I:C)-Kostimulation in hippocampalen und kortikalen Neuronen überschritten wird. Der Mechanismus der CCL5-

Überexpression wird durch das Zusammenspiel von TLR3-Aktivierung und den inflammatorischen Zytokinen (IFN- $\gamma$  und TNF) reguliert. NF $\kappa$ B wird durch TNF aktiviert und IFN- $\gamma$  reguliert die CCL5-Expression durch TLR3-Aktivierung hoch. Dieser Regulationsmechanismus wird als STAT1-abhängig vermutet (Homma et al., 2010). Ein erhöhter IL6-Blutspiegel wurde in den Arbeiten anderer Forscher ebenfalls in Personen, die unter depressiven Störungen litten, sowie in Tiermodellen der Depression und des chronischen Stresses vorgefunden (zusammengefasst in (C. Hoyo-Becerra, Huebener, A., et al., 2013)). Auch in Untersuchungen von Yang et al. wurde eine erhöhte Konzentration von proinflammatorischen Zytokinen, wie IL6, TNF und IL1 $\beta$  bei Patienten mit schweren depressiven Störungen, mit Depression und mit Suizidgedanken assoziiert (Yang et al., 2015). Yang und Kollegen nutzten die Serum-IL6-Ausgangswerte als wertvolle prädiktive Biomarker, um die therapieresistenten Patienten mit MDD sowie bipolarer Störung für den besten Erfolg der schnellen antidepressiven Wirkung von Ketamin zu unterscheiden. Die Hemmung dieser Zytokine verbesserte depressive Symptome und erhöht die Reaktion auf Antidepressiva (zusammengefasst in (Yang et al., 2015)). Im Einklang mit diesen Daten stehen die in dieser Arbeit beschriebenen Expressionslevel von *Il6* und *Tnf* in hippocampalen und kortikalen Neuronen, die nach mIFN- $\alpha$ /Poly(I:C)-Kostimulation für 24 h im Vergleich zur Monostimulation als stark erhöht identifiziert werden. Eine Produktion und Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen/Chemokinen durch Neuronen ist eine Folge der Signalwegaktivierung, die durch IFN- und TLR3-Rezeptoren gesteuert werden könnte. Weitere proinflammatorische Zytokine, die in dieser Arbeit untersucht werden sind *Cxcl1* (CXCL1) und *Cxcl10* (CXCL10) (Kapitel 4.3). Diese Chemokine nehmen an der neuronalen Differenzierung und Reifung von Astrozyten in kultivierten Neurosphären teil, was darauf hindeutet, dass sie in einer autokrinen oder parakrinen Weise die neuronalen Vorläuferzellen beeinflussen und ihre Reaktionsfähigkeit auf Entzündung oder Krankheit verändern (zusammengefasst in (C. Hoyo-Becerra, Huebener, A., et al., 2013)). Des Weiteren hat Barbosa et al. entdeckt, dass das Chemokin CXCL10 im Serum von Patienten mit bipolaren Störungen gegenüber Kontrollpersonen erhöht war (Barbosa et al., 2013). Auch die Ergebnisse der Studie von Qi et al. zeigten, dass die CXCL10-Produktion in humanen Monozyten mehr durch TNF als durch IFN- $\gamma$  induziert wird. IFN- $\gamma$  erhöht die TNF-induzierte CXCL10-Produktion synergetisch durch STAT1 und NF $\kappa$ B via JAK-Signalweg (Qi et al., 2009). Mit diesen Daten im Einklang stehen die stark erhöhten Expressionslevel von *Cxcl1* (CXCL1) und *Cxcl10* (CXCL10), die durch die synergetische Wirkung von mIFN- $\alpha$  und Poly(I:C) in hippocampalen und kortikalen Neuronen auf molekularen und proteinbiochemischen Ebenen identifiziert werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit werden durch die *in vivo*-Studie von Hoyo-Becerra et al. an einem Depressionsmodell einer Maus unterstützt. Sie wiesen erhöhte Expressionslevel von *Cxcl1*, *Cxcl10*, *Ccl5*, *Tnf*, *Il6* und *Timp-1* durch die synergetische Wirkung von mIFN- $\alpha$  und Poly(I:C) auf molekularer Ebene im Hippocampus und im präfrontalen Kortex der Maus nach (C. Hoyo-Becerra et al., 2015). Es lässt ein allgemeines Regulationsmuster der Produktion und die Freisetzung von proinflammatorischen Zy-

tokinen/Chemokinen *in vitro* (Kapitel 4.3) und *in vivo* (C. Hoyo-Becerra et al., 2015) sowie in HCV-Patienten mit Depressionen und Patienten mit schweren depressiven Episoden erkennen. Die proinflammatorische Zytokine *Tnf*, *Il6*, *Cxcl10*, *Cxcl1*, *Ccl5* und *Ifng* stellen ein gemeinsames genetisches Merkmal als Verbindung zwischen den Entzündungsprozessen im Gehirn und Pathophysiologie einer endogenen/exogenen IFN-vermittelten Depression dar.

#### Synergetische mIFN- $\alpha$ /Poly(I:C)-Dysregulation der Serotonin und Dopamin-Biosynthese in hippocampalen und kortikalen Neuronen

Bisherige Daten zeigen, dass Immunmediatoren, einschließlich IFN- $\alpha$ , signifikante Veränderungen enzymatischer Wege in den Metabolismus der wichtigen Neurotransmitter einschließlich Serotonin, Dopamin und Noradrenalin induzieren (zusammengefasst in (Schaefer et al., 2012)). Als wesentliche Ursache der Entstehung von Depressionen unter der Behandlung mit IFN- $\alpha$  wird die erhöhte Aktivität des Enzyms Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) im Serotoninstoffwechsel und eine erhöhte Expression von Serotonintransportern gesehen (Schaefer et al., 2003). IDO ist ein ubiquitäres Enzym, das Tryptophan in Kynurenin abbaut und seine Verfügbarkeit für die Synthese von Serotonin verringert. Es wurde auch von Maes et al. und Haroon et al. gezeigt, dass die Aktivierung von IDO mit einer starken Entzündung und der Schwere der depressiven Symptome einhergeht (Maes et al., 2002) und während der IFN-Therapie in humanen Mikroglia und Makrophagen stark überexprimiert und aktiviert ist (zusammengefasst in (Haroon et al., 2012)). Mit diesen Vordaten im Einklang stehen auch die in dieser Arbeit nachgewiesene signifikant hohe *Ido1*-Expression in kortikalen Neuronen nach 24 h mIFN- $\alpha$ /Poly(I:C)-Kostimulation. Diese Ergebnisse korrelieren mit den Ergebnissen einer Studie von Liu et al. an einem Depressionsmodell der Ratte, die durch depressionsartige Verhaltensweise charakterisiert ist und in der ein Anstieg von IFN- $\gamma$ , TNF sowie IDO-Aktivität und ein geringes Serotoninlevel im präfrontalen Kortex der Ratte festgestellt wurde (Liu et al., 2013). In hippocampaler Zellkultur wird in der vorliegenden Arbeit ein ansteigender Trend der *Ido1*-Expression nach der mIFN- $\alpha$ /Poly(I:C)-Kostimulation nachgewiesen. Die synergetische mIFN- $\alpha$ /Poly(I:C)-Aktivierung von *Ido1* deutet auf eine indirekte *Ido1*-Aktivierung in der neuronalen Zellkultur. Auch Fujigaki et al. und Maes et al. zeigten eine IFN-induzierte Zytokin/Chemokin-Produktion von IL1, IL2, IL6 sowie IFN- $\gamma$  und TNF, die ebenfalls IDO aktivieren (Fujigaki et al., 2006; Maes, 2011). Liu et al. vermutet, dass diese IDO-Aktivierung durch einzelne proinflammatorische Zytokine alleine und durch deren Kombination in die Hyperaktivität der HPA-Achse bei Depressionen einbezogen werden kann (W. Liu et al., 2013). Im Einklang mit diesen Befunden stehen die eigenen Ergebnisse dieser Arbeit: Eine erhöhte Expression der proinflammatorischen Zytokine IL6, TNF und IFN- $\gamma$  in hippocampalen und kortikalen Neuronen wurde nach der synergetischen mIFN- $\alpha$ /Poly(I:C)-Kostimulation ebenfalls auf der molekularbiologischen und proteinbiochemischen Ebene *in vitro* bestätigt. Das Expressionsniveau von IFN- $\gamma$  in kortikalen Neuronen ist auf proteinbiochemischer Ebene höher als das von hippocampalen Neuronen. Dies



könnte die signifikant hohe *Ido1*-Expression in kortikalen Neuronen erklären. Die in diesem neuronalen Zellkulturmodell beobachtete synergetisch erhöhte *Ido1*-Expression spielt eine zentrale Rolle in der Vermittlung eines depressionsartigen Verhaltens als Antwort auf eine Immunaktivierung und wird vermutlich gleichzeitig auf indirektem Weg nämlich durch „Downstream“-Zytokine (IL6, IFN- $\gamma$ , TNF) aktiviert.

Ein möglicher Zusammenhang zwischen der Veränderung der Neurotransmitterbiosynthese, an der IDO beteiligt ist, und der Hochregulation des „Depressionsgens“ GCH1 wird in der vorliegenden Arbeit vermutet. Ähnlich wie bei IDO stimulieren IFN- $\alpha$ -induzierte „Downstream“-Zytokine, besonders IFN- $\gamma$  und TNF, die Expression von GCH1 (zusammengefasst in (C. Hoyo-Becerra et al., 2014)). Diese IFN-Stimulation von GCH1 beeinträchtigt die Bildung von Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>), eines limitierenden Faktors der Serotonin/Dopamin-Biosynthese, da GCH1 das Tetrahydrobiopterin(BH<sub>4</sub>)-abbauende Enzym kodiert. In dieser Arbeit wurde sowohl die Expression von *Ido1* als auch von *Gch1* durch die synergetische Wirkung von IFN/Poly(I:C) in murinen hippocampalen und kortikalen Neuronen als stark erhöht bestätigt. Es wurde bereits gezeigt, dass GCH1 an der Entstehung der IFN-vermittelten Depression beteiligt ist, da in der zerebrospinalen Flüssigkeit von Patienten mit chronischer HCV-Infektion eine reduzierte BH<sub>4</sub>-Konzentration während der IFN-Therapie nachgewiesen wurde (zusammengefasst in (C. Hoyo-Becerra et al., 2014)). Ein direkter Beitrag zur Pathogenese der endogenen/exogenen Depression scheint durch eine genetische Variable (GCH1) sehr wahrscheinlich zu sein, obwohl Depression eine Erkrankung multifaktorieller Natur ist. Diese These und die Bedeutung von GCH1 in der Pathogenese der Depression müsste in einem *in vivo*-Depressionsmodell unter Betrachtung weiterer genetischer Variablen, die den Krankheitsphänotyp ausmachen, detaillierter untersucht werden.

Auch die Rolle des Serotonintransporters ist in der Entwicklung der psychischen Störungen nicht unerheblich. Die modernen Antidepressiva zielen auf die Hemmung der Serotonin-Wiederaufnahme durch die Blockierung der Serotonintransporter (Selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer, SSRI), um die Konzentration von Serotonin im synaptischen Spalt zu erhöhen. Es liegen noch keine wissenschaftlichen Daten zur direkten Aktivierung von Serotonintransportern durch IFN- $\alpha$  vor, jedoch verbessert es die Serotonin-Wiederaufnahme aus dem extrazellulären Raum, was zur Verringerung der Serotoninkonzentration im synaptischen Spalt führt (zusammengefasst in (C. Hoyo-Becerra et al., 2014)). In der vorliegenden Arbeit wurde ein signifikanter Anstieg der Expression des Serotonintransporters in hippocampalen und kortikalen Neuronen nach IFN/Poly(I:C)-Kostimulation *in vitro* bestätigt. Diese Ergebnisse stehen mit Daten von Zhu et al. im Einklang, dass eine akute Serotonintransporter-Aktivierung in Neuronen durch proinflammatorische Zytokine, wie IL1 $\beta$  und TNF via p38 MAPK Signalweg stattfindet (Zhu et al., 2006). Dies bestärkt die Vermutung, dass eine synergetische Veränderung der 5-HT-Biosynthese

und der Neurotransmittertransmission durch mIFN- $\alpha$ /Poly(I:C) auf indirektem Wege nämlich durch „Downstream“-Zytokine zur Entwicklung einer endogenen/exogenen Depression beiträgt.

Des Weiteren wird die komplexe Wirkung von Serotonin auch durch eine große Anzahl von 5-HT-Rezeptoren vermittelt. Der Serotonin-1A-Rezeptor (5-Htr1a) ist einer der am häufigsten vorkommenden Rezeptoren im Hippocampus und wurde in der Literatur mit affektiven Störungen in Verbindung gebracht (Lopez-Figueroa et al., 2004). Mehrere Studien zeigen, dass IFN-induzierte Depressionen mit der Modulation der 5-HT-Rezeptor-Konzentration im Gehirn verbunden sind. Eine erhebliche Abnahme der 5-HTR1A mRNA wurde im Hippocampus von Probanden mit bereits bestehenden schweren depressiven Episoden berichtet (zusammengefasst in (Cai et al., 2005)). Zudem wurde die Dichte des postsynaptischen 5-HT1A-Rezeptors im präfrontalen Kortex der meisten Suizidopfer stark erhöht vorgefunden (zusammengefasst in (Sibille et al., 2004)). Mit diesen Forschungsdaten im Einklang stehen die in dieser Arbeit beschriebene IFN/Poly(I:C)-abhängige Absenkung der 5-Htr1a-Expressionslevel im Hippocampus, sowie der signifikante Anstieg der 5-Htr1a-Expression im präfrontalen Kortex *in vitro*. Diese eindeutigen Befunde der neuronalen Zellkultur in der vorliegenden Arbeit deuten auf das mögliche Vorhandensein eines gemeinsamen genetischen Musters in der Pathogenese der IFN-vermittelten und idiopathischen Depression hin.

Zahlreiche Veränderungen in der regionalen Hirnaktivität, die abnorme metabolische Aktivität im präfrontalen Kortex und ein veränderter Dopamin-Stoffwechsel wurde bei Depressionen dokumentiert (zusammengefasst in (Raison et al., 2006)). Es ist bekannt, dass Depressionen auch mit einem Nettorückgang der Dopamin-Menge im Gehirn verbunden sind. Dies zeigen auch die Ergebnisse von Laasonen-Balk et al., die auf eine Hochregulierung der Dopamintransporter-Dichte bei primärer Dysfunktion des dopaminergen Systems in einer Gruppe depressiver Patienten deutet, was in einer wirksameren Wiederaufnahme von Dopamin in die präsynaptischen Neuronen resultierte. Dies führte zu einer geringeren Konzentration von Dopamin im synaptischen Spalt und bewirkte eine Reduktion der dopaminergen Neurotransmission (Laasonen-Balk et al., 1999). Eine Hemmung des Dopamintransporters ist für die Wirkung einiger Antidepressiva mitverantwortlich. Als Ausgleich dazu wird die Dopaminrezeptor-Dichte sekundär hochreguliert, um die synaptische Dopamin-Transmission zu erhöhen. In Übereinstimmung mit diesen Daten von Laasonen-Balk et al. wird in dieser Arbeit eine synergetische Wirkung von mIFN- $\alpha$ /Poly(I:C) auf die veränderte Expression des Dopamintransporters (*Slc6a3*) *in vitro* nachgewiesen. Interessanterweise verhält sich die *Slc6a3*-Expression sowohl in hippocampalen als auch in kortikalen Neuronen konträr zu einander: Im Hippocampus wird die *Slc6a3*-Expression besonders während der Kostimulation signifikant induziert, während im präfrontalen Kortex die *Slc6a3*-Expression durch mIFN- $\alpha$ /Poly(I:C)-Kostimulation im Vergleich zur mIFN- $\alpha$ -Monostimulation eher gehemmt wird. Die Regulation der Dopamintransporter-Expression unter der synergetischen Wirkung von mIFN- $\alpha$ /Poly(I:C) scheint

gewebespezifisch zu sein. In Anbetracht der Heterogenität der neurobiologischen Pathophysiologie der Depression sollte eine detailliertere Untersuchung an einem Depressionstiermodell durchgeführt werden, um die These zur synergetischen mIFN- $\alpha$ /Poly(I:C)-vermittelten Dysregulation der Serotonin und Dopamin-Biosynthese *in vivo* zu stützen.

### 5.3 STAT1 als mögliches molekulares Target zur antiinflammatorischen Wirkung im Gehirn

Die STAT1-Hyperaktivierung ist eine der wichtigsten Phänomene bei vielen akuten oder chronischen Erkrankungen (zusammengefasst in (Menegazzi et al., 2014)). Wie bereits in der Studie von Schlaak et al. und Hoyo-Becerra et al. erwähnt, wurden erhöhte STAT1-Expressionslevel sowohl im Blut von HCV-Patienten gefunden, die unter einer IFN-Therapie eine Depression entwickelt haben, als auch im Blut von Patienten mit schweren depressiven Episoden und in Gehirngeweben von Personen, die Suizid begangen hatten (C. Hoyo-Becerra, Huebener, A., et al., 2013; Schlaak et al., 2012). Wang und Kollegen zeigten, dass die transkriptionelle Antwort auf IFN- $\alpha$  in Neuronen vollständig von STAT1 abhängig ist, obwohl es für andere Zelltypen in der Literatur Hinweise auf eine STAT1-unabhängige Zellantwort auf IFN- $\alpha/\beta$  gab. Darüber hinaus zeigten Wang und Kollegen Neuronen als wichtige Komponente des ZNS während der IFN-Antwort, die somit eine biologische Basis für die systemische Neuropathophysiologie durch IFN darstellen (Wang & Campbell, 2005; Wang et al., 2008). Dies wiederum ließ sie vermuten, dass Neuronen unter dem Einfluss von IFN- $\alpha/\beta$  das angeborene Potenzial entfalten, sich gegen eine virale Infektion im Gehirn zu verteidigen zu können (Wang & Campbell, 2005). Im Einklang mit diesen Daten stehen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit: Eine starke STAT1-Überexpression in hippocampalen und kortikalen Neuronen wird durch synergetische Wirkung von mIFN- $\alpha$ /Poly(I:C) auf molekularbiologischen und proteinbiochemischen Ebenen *in vitro* nachgewiesen. Die STAT1-Aktivierung beeinflusst die IFN-vermittelte Induktion der proinflammatorischen Zytokine, die eine mögliche Überexpression von inflammatorischen Genen steuert. Dabei wird das STAT1-Protein zusätzlich durch die TLR3-vermittelte Aktivierung der angeborenen Immunantwort verzögert nach 24 h über die Sekundärproduktion von Zytokinen aktiviert. Dieses Phänomen wurde zuvor von anderen Forschern unter anderem in menschlichen PBMCs und in Astrozyten beobachtet (zusammengefasst in C. Hoyo-Becerra, Huebener, A., et al., 2013)). Auch Luu und Kollegen zeigten, dass alle TLRs einschließlich Plasmamembran-gebundene TLR2- und TLR4- sowie endosomale TLR3, TLR7 und TLR9-Rezeptoren eine STAT1-Phosphorylierung induzieren können. Die Aktivierung über TLR2/4/7/9 erfolgt direkt nach wenigen Minuten, während die TLR3-abhängige STAT1-Phosphorylierung verzögert abläuft (Luu et al., 2014). In der vorliegenden Arbeit fällt auf, dass das STAT1-Protein in kortikalen Neuronen signifikant stärker als in hippocampalen Neuronen durch Kostimulation aktiviert wird. Der präfrontale Kortex wird als eine entscheidende kortikale Region angesehen, die in

einem putativen Gehirnnetzwerk während der Pathogenese der Depression involviert ist (zusammengefasst in (Sibille et al., 2004)). Die in dieser Arbeit gefundene STAT1-Aktivierung deutet auf eine komplexe Rolle von STAT1 und seine Aktivierung durch IFN/Poly(I:C) in Neuronen hin. Dies scheint essentiell in der STAT1-abhängigen Regulation der „Depressionsgene“ zu sein, da es somit eine mögliche Auswirkung auf die Pathogenese der endogenen/exogenen (IFN-vermittelten) Depression haben kann.

Menegazzi und Kollegen zeigten die kritische Rolle von STAT1 in einer Vielzahl von Entzündungserkrankungen und schlugen die Hemmung dieses Proteins als eine vielversprechende therapeutische Alternative für eine neue Klasse von entzündungshemmenden Medikamenten vor (Menegazzi et al., 2014). In der vorliegenden Arbeit wird durch den gezielten, transienten „Knockdown“ von STAT1 eine signifikante Suppression mehrerer „Depressionsgene“ - *Rtp4*, *Tnfrsf10*, *Gbp1*, *Rbck1*, *Psmb9* - besonders in hippocampalen Neuronen und *Gbp1*, *Rbck1*, *Psmb9* auch in kortikalen Neuronen erzielt. Diese stark hochregulierten Gene wurden bereits in einem *in vivo*-Depressionsmodell der Maus als mögliche Marker für eine bevorstehende Depression vermutet (C. Hoyo-Becerra et al., 2015). In der vorliegenden Arbeit wird eine signifikante Suppression der „Depressionsgene“ *Gch1*, *Disc1*, *Tor1b*, *Mef2a* in kortikalen Neuronen nach dem STAT1-„Knockdown“ *in vitro* bestätigt. Besonders die *Gch1*-Expression bleibt sowohl in hippocampalen als auch in kortikalen STAT1-supprimierten Neuronen signifikant niedrig. *Gch1* kodiert für ein geschwindigkeitsbestimmendes Enzym (GCH1), das durch IFN-Stimulation die Bildung von Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>), einen essentiellen Cofaktor für die Serotonin/Dopamin-Biosynthese, beeinträchtigt. Trotz einer anschließende mIFN- $\alpha$ /Poly(I:C)-Kostimulation der STAT1-supprimierten Ansätze wird eine signifikant erniedrigte Expression von *Gch1* in beiden Geweben und von *Disc1* sowie *Mef2a* nur in kortikalen Neuronen nachgewiesen. Auffallend ist die signifikant niedrige *Mef2a*-Expression, die durch mIFN- $\alpha$ /Poly(I:C) nicht induzierbar ist. Dies deutet auf einen effizienten „Knockdown“ der *Mef2a*-Expression hin. In Anbetracht dieser Ergebnisse scheint die Expression dieser „Depressionsgene“ einem STAT1-abhängigen Mechanismus unterliegen. Da erstens das Kandidatengen *Gch1* in die Serotonin/Dopamin-Biosynthese involviert ist, zweitens *Disc1* mit der Entstehung von Schizophrenie und Depression und drittens *Mef2a* mit der Hemmung des Neuritenwachstums und der kortikalen Entwicklung assoziiert ist, scheint die transiente STAT1-Suppression ein wirksames molekulares Target für die Hemmung der „Depressionsgen“-Funktion zu sein. Dies könnte der Entwicklung einer exogenen/endogenen Depression entgegenwirken. Dieses Ergebnis sollte durch weitere funktionellen Analysen und Untersuchungen in einem *in vivo*-Depressionsmodell genauer erforscht werden.

Eine besondere Stellung nimmt sowohl die Überexpression von *Gch1* als auch von *Ido1* durch mIFN- $\alpha$ /Poly(I:C)-Stimulation in der Pathogenese der IFN-vermittelten Depression ein, welche serotonerge und dopaminerge Neurotransmittersysteme dereguliert und auch für die idiopathische

Depressionen relevant sein könnte. Da IDO1 durch Zytokine (besonders IFN- $\gamma$ , TNF) und Entzündungsfaktoren (Prostaglandin E2, PGE2) aktiviert wird, könnten Entzündungen eine doch unterschätzte Rolle in der Pathogenese der Depression spielen (Muller et al., 2007). Weiterhin wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt, dass der Konzentrationsanstieg der proinflammatorischen Zytokine wie IL6 und IL1 bei depressiven Patienten mit der Schwere der Depression und der Hyperaktivität der HPA-Achse korreliert (zusammengefasst in (Muller & Schwarz, 2007)). Bekannt ist, dass IL6 zur IDO-Aktivierung über seinen stimulatorischen Effekt auf PGE2 beiträgt, welches wiederum als Cofaktor bei der IDO-Aktivierung fungiert. Dies stimmt mit der Korrelation der gesteigerten IL6-Produktion mit einem verringerten Tryptophanspiegel (Präkursor von Serotonin) bei depressiven Patienten überein und hebt die wichtige Rolle von IL6 für den Serotoninmetabolismus bei Depressionen hervor (zusammengefasst in (Muller & Schwarz, 2007)). Auch in dieser Arbeit konnten signifikant erhöhte Expressionen von *Il6* (IL6), *Ifng* (IFN- $\gamma$ ), *Tnf* (TNF) und von *Ido1* in murinen hippocampalen und kortikalen Neuronen nachgewiesen werden. Yang et al. zeigten hingegen, dass eine Hemmung dieser Zytokine depressive Symptome verringern konnte und die Reaktion auf Antidepressiva erhöhte (Yang et al., 2015). Auch Ergebnisse der Studie von O'Connor et al. zeigten, dass durch eine Inhibierung der LPS-induzierten Expression von proinflammatorischen Zytokinen (IFN- $\gamma$ , TNF), mithilfe des entzündungshemmenden Tetrazyklin-Derivats, die IDO-Aktivierung indirekt gehemmt wird. Dadurch und durch eine direkte Hemmung von IDO mittels IDO-Antagonisten wird die Entwicklung von LPS-induziertem, depressionsartigem Verhalten bei Mäusen verhindert (O'Connor et al., 2009). In der vorliegenden Arbeit konnte durch gezielte STAT1-Suppression die Expression der Zytokine *Il6*, *Ccl5* und *Cxcl10* in hippocampalen und kortikalen Neuronen trotz mIFN- $\alpha$ /Poly(I:C)-Kostimulation *in vitro* signifikant erniedrigt nachgewiesen werden. Dies deutete auf einen STAT1-abhängigen Regulationsmechanismus der Zytokinexpression hin. Im Gegensatz zu den STAT1-abhängigen Zytokinen *Il6*, *Ccl5* und *Cxcl10* fällt in der vorliegenden Arbeit eine erhöhte Expression der proinflammatorischen Zytokine *Ifng* und *Tnf* nach der STAT1-Suppression in primären Neuronen auf. Dies korreliert mit dem Befund einer erhöhten Serumkonzentration von IFN- $\gamma$  während einer Infektion mit dem Lymphozytären-Choriomeningitis-Virus in STAT1-defizienten Mäusen, welche wiederum auf eine mögliche STAT1-unabhängigen Induktion der IFN- $\gamma$ -Expression durch endogene Zytokine deutet (Nguyen et al., 2000). Die STAT1-unabhängige Induktion dieser IFN-Antwort kann durch Aktivierung des alternativen IFN- $\alpha$ -Rezeptor-gekoppelten Signaltransduktionsweges ablaufen. So wird IFN- $\gamma$ -Expression in mononukleären Leukozyten durch IFN- $\alpha$  aufgrund der STAT4-Aktivierung induziert (zusammengefasst in (Wang & Campbell, 2005)). Welche Signalwege dabei in hippocampalen und kortikalen Neuronen aktiviert werden, müsste in weiteren Studien genauer untersucht werden. Die erhöhten Expressionslevel von *Ifng* und *Tnf* in transient STAT1-supprimierten Neuronen könnten durch eine partielle Aktivierung der viralen STAT1-abhängigen Immunantwort durch exogene siRNA hervorgerufen worden sein.

Infolgedessen wird in dieser Arbeit angenommen, dass durch hohe Expressionslevel der IDO-aktivierenden Zytokine *Ifng* und *Tnf* auch die *Ido1*-Expression in STAT1-supprimierten Neuronen stark induziert werden könnte. Dies korreliert jedoch nicht mit den Ergebnissen dieser Arbeit. Die *Ido1*-Expression bleibt nach einer STAT1-Suppression in hippocampalen und kortikalen Neuronen trotz anschließender mIFN- $\alpha$ /Poly(I:C)-Kostimulation signifikant niedrig. In hippocampalen Neuronen ist die *Ido1*-Suppression so effizient, dass sie durch mIFN- $\alpha$ /Poly(I:C) nicht stimulierbar ist. Die überexprimierten *Ifng* und *Tnf* scheinen die *Ido1*-Expression in STAT1-supprimierten Neuronen nicht direkt zu beeinflussen. Eine Vielzahl an Signalwegen (MAPK-, NF $\kappa$ B-, JAK/STAT-Signalweg) können eine IDO-Expression in Reaktion auf verschiedene Stimuli modulieren. Lepiller et al. zeigte in seiner Studie, dass hepatisches IDO durch IFN- $\gamma$  stark induziert wird und dass die andauernde HCV-Replikation die IDO-Expression deutlich hochregulierte. Eine gemeinsame IRF1/STAT1-Bindung an dem IDO-Promotor scheint bei der Regulation der IDO-Expression eine wichtige Rolle zu spielen (Lepiller et al., 2015). Dieser Mechanismus wird auch in dieser Arbeit für die *Ido1*-Regulation in murinen hippocampalen und kortikalen Neuronen vermutet. Durch die STAT1-Hemmung in murinen Neuronen wird die IDO-Expression ebenfalls herunterreguliert. Somit spielt die STAT1-Suppression eine entscheidende Rolle in der Regulation der STAT1-abhängigen Zytokin- sowie der IDO-Expression.

Des Weiteren beeinflusst die STAT1-Suppression nicht nur die *Ido1*-Expression, sondern zeigt auch eine inhibierende Wirkung auf das Expressionsniveau des Serotonintransporters (*Slc6a4*) sowohl in hippocampalen als auch in kortikalen Neuronen. Trotz synergetischer mIFN- $\alpha$ /Poly(I:C)-Wirkung in STAT1-supprimierten Neuronen konnte keine Induktion der (*Slc6a4*)-Expression nur in kortikalen Neuronen festgestellt werden. Dies lässt vermuten, dass die suppressive Wirkung von STAT1 gewebespezifisch ist. Mit diesen Ergebnissen der indirekten *Slc6a4*-Suppression in neuronaler Zellkultur stehen genetische Studien von Haroon et al. im Einklang, in der die Polymorphismen in der Promotorregion des Serotonintransporter-Gens 5-HTTLPR mit IFN-induzierten Verhaltensänderungen bei HCV-Patienten verbunden sind. HCV-Patienten mit LL Genotyp der 5-HTTLPR hatten eine geringere Wahrscheinlichkeit schwere Depressionen oder depressive Symptome während einer IFN-Therapie zu entwickeln, als Patienten ohne diesen Polymorphismus (Haroon et al., 2012). Somit könnte die Inhibition der Serotonintransporter-Expression durch die STAT1-Suppression die Wahrscheinlichkeit an Depressionen zu erkranken minimieren. Dies unterstützt die These einer gezielten STAT1-Suppression im Gehirn als ein möglicher therapeutischer Ansatz zur Verbesserung/Minderung der Symptome einer exogenen/endogenen Depression.

Der JAK/STAT-Signalweg ist ein potenter Mechanismus des Immunsystems. Da die transkriptionelle Antwort auf IFN- $\alpha$  in Neuronen vollständig von STAT1 abhängig ist (Wang & Campbell, 2005), spielt STAT1 eine überragende Rolle im IFN-abhängigen Signalweg der Gehirnzellen und scheint ein Schlüsselmolekül in der Regulation der besonders wichtigen „Depressionsgene“, Neu-

rotransmittermoleküle und der „Downstream“-Zytokine zu sein. Durch weitere Untersuchungen in einem *in vivo*-Depressionsmodell könnte ein tiefgründigerer Einblick in die Bedeutung der „Depressionsgene“, sowie in die Pathogenese der IFN-vermittelten Depression geschaffen werden. Dabei könnte STAT1 als vielversprechendes Target für den therapeutischen Eingriff in den physiopathologischen Mechanismus einer Depression dienen.

## 6 Zusammenfassung

Um neue Erkenntnisse über die Bedeutung der 15 „Depressionsgene“ im Gehirn für die Pathophysiologie der IFN- $\alpha$ -induzierten sowie der endogenen Depressionserkrankungen zu erlangen, wurde in dieser Dissertation zunächst ein *in vitro*-Zellkultursystem aus murinen hippocampalen und kortikalen Primärneuronen entwickelt. Durch Nachahmung einer Hepatitis-C-Virus-Therapie (HCV) durch Kostimulation mit murinem Interferon-alpha (mIFN- $\alpha$ ) (1000 IU/ml) und dem TLR3-Agonisten Polyinosin:Polycytidylsäure (Poly(I:C)) (100  $\mu$ g/ml) wurde eine starke Überexpression der „Depressionsgene“ *Gch1*, *Disc1*, *Tor1b*, *Dynl1* und *Mef2a* in primären Neuronen *in vitro* gezeigt. *Stat1*, *Ube2L6*, *Rtp4* und *Gbp1* wurden genau so wie in den *in vitro* Vorversuchen mit der hippocampalen HT22 Zelllinie höher als alle anderen „Depressionsgene“ exprimiert. Die schnelle Regulation dieser Gene lässt vermuten, dass diese als nützliche Marker für eine Depression geeignet sind. Die synergistische mIFN/Poly(I:C)-Wirkung förderte zugleich eine Überexpression der proinflammatorischen Zytokine *Cxcl1*, *Cxcl10*, *Ccl5*, *Tnf*, *Il6* und *Ifng* auf molekularen und proteinbiochemischen Ebenen in hippocampalen und kortikalen Neuronen *in vitro*, die hauptsächlich einer STAT1-abhängigen transkriptionellen Antwort auf IFN- $\alpha$  unterliegen. Diese „Downstream“-Zytokine stellen einen möglichen Zusammenhang zwischen den Entzündungsprozessen im Gehirn und der Veränderung der Neurotransmitterbiosynthese durch eine synergetisch erhöhte Aktivität des Enzyms Indolamin-2,3-Dioxygenase (*Ido1*), des Serotonintransporters (*Slc6a4*) und -rezeptors (*Htr1a*) sowie durch eine gewebespezifische Veränderung der Expression des Dopamintransporters (*Slc6a3*) auf indirektem Weg in primären Neuronen *in vitro* dar. Da die transkriptionelle Antwort auf IFN- $\alpha$  in Neuronen vollständig von STAT1 abhängt, beeinflusst die in dieser Arbeit gefundene starke IFN/Poly(I:C)-vermittelte STAT1-Aktivierung in primären Neuronen die Induktion der proinflammatorischen Zytokine, die wiederum eine mögliche Überexpression von inflammatorischen Genen steuert. Durch einen gezielten STAT1-„Knockdown“ mittels RNAi-Technologie wurde eine signifikante Suppression der „Depressionsgene“ *Gch1*, *Disc1*, *Mef2a* in hippocampalen und kortikalen Neuronen *in vitro* nachgewiesen. Da erstens das Kandidatengen *Gch1* in die Serotonin/Dopamin-Biosynthese involviert ist, zweitens *Disc1* mit der Entstehung von Schizophrenie und Depression und drittens *Mef2a* mit der Hemmung des Neuritenwachstums und der kortikalen Entwicklung assoziiert ist, scheint die transiente STAT1-Suppression ein wirksames molekulares Target für die Hemmung der „Depressionsgen“-Funktion zu sein. Die STAT1-Suppression hat trotz anschließender mIFN/Poly(I:C)-Kostimulation ebenfalls eine signifikant hemmende Wirkung auf die Expression von *Ccl5*, *Il6* und *Cxcl10*, der *Ido1* und *Slc6a4* in primären Neuronen. Somit spielt STAT1 eine wichtige Rolle im IFN-abhängigen Signalweg der Gehirnzellen und scheint ein Schlüsselmolekül in der Regulation der besonders wichtigen „Depressionsgene“, Neurotransmittermoleküle und der „Downstream“-Zytokine zu sein. Die gezielte STAT1-Suppression im Gehirn kann einem möglichen therapeutischen Ansatz zur Verbesserung/Minderung der Symptome einer exogenen/endogenen Depression dienen.



## 7 Literaturverzeichnis

1. Abu Sin, M., Alpers, K., Beermann, S., Behnke S., Bös, L. (2015). Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2014. Robert Koch-Institut Ed. Berlin: BGZ Druckzentrum GmbH;
2. Antaki, N., Craxi, A., Kamal, S., Moucari, R., Van der Merwe, S., Haffar, S., Gadano, A., Zein, N., Lai, C. L., Pawlotsky, J. M., Heathcote, E. J., Dusheiko, G., & Marcellin, P. (2010): The neglected hepatitis C virus genotypes 4, 5 and 6: an international consensus report. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*, 30(3), 342-355.
3. Barbosa, I. G., Rocha, N. P., Bauer, M. E., de Miranda, A. S., Huguet, R. B., Reis, H. J., Zunszain, P. A., Horowitz, M. A., Pariente, C. M., & Teixeira, A. L. (2013): Chemokines in bipolar disorder: trait or state? *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.*, 263(2), 159-165.
4. Bokemeyer, M., Ding, X. Q., Goldbecker, A., Raab, P., Heeren, M., Arvanitis, D., Tillmann, H. L., Lanfermann, H., & Weissenborn, K. (2011): Evidence for neuroinflammation and neuroprotection in HCV infection-associated encephalopathy. *Gut*, 60(3), 370-377.
5. Brewer, G. J. (1995): Serum-free B27/neurobasal medium supports differentiated growth of neurons from the striatum, substantia nigra, septum, cerebral cortex, cerebellum, and dentate gyrus. *J. Neurosci. Res.*, 42(5), 674-683.
6. Brewer, Gregory J. (1997): Isolation and culture of adult rat hippocampal neurons. *J. Neurosci. Methods*, 71(2), 143-155.
7. Broering, R., Zhang, X., Kottlil, S., Trippler, M., Jiang, M., Lu, M., Gerken, G., & Schlaak, J. F. (2010): The interferon stimulated gene 15 functions as a proviral factor for the hepatitis C virus and as a regulator of the IFN response. *Gut*, 59(8), 1111-1119.
8. Cai, W., Khaoustov, V. I., Xie, Q., Pan, T., Le, W., & Yoffe, B. (2005): Interferon-alpha-induced modulation of glucocorticoid and serotonin receptors as a mechanism of depression. *J. Hepatol.*, 42(6), 880-887.
9. Cameron, J. S., Alexopoulou, L., Sloane, J. A., DiBernardo, A. B., Ma, Y., Kosaras, B., Flavell, R., Strittmatter, S. M., Volpe, J., Sidman, R., & Vartanian, T. (2007): Toll-like receptor 3 is a potent negative regulator of axonal growth in mammals. *J. Neurosci.*, 27(47), 13033-13041.
10. Capuron, L., & Miller, A. H. (2011): Immune system to brain signaling: neuropsychopharmacological implications. *Pharmacol. Ther.*, 130(2), 226-238.
11. Capuron, L., Raison, C. L., Musselman, D. L., Lawson, D. H., Nemeroff, C. B., & Miller, A. H. (2003): Association of exaggerated HPA axis response to the initial injection of interferon-alpha with development of depression during interferon-alpha therapy. *Am. J. Psychiatry*, 160(7), 1342-1345.
12. Chevaliez, S., & Pawlotsky, J. M. (2007): Interferon-based therapy of hepatitis C. *Advanced drug delivery reviews*, 59(12), 1222-1241.
13. Choo, Q. L., Kuo, G., Weiner, A. J., Overby, L. R., Bradley, D. W., & Houghton, M. (1989): Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*, 244(4902), 359-362.
14. Claes, S. J. (2004): CRH, stress, and major depression: a psychobiological interplay. *Vitam. Horm.*, 69, 117-150.
15. Clemens, M. J. (2003): Interferons and apoptosis. *J. Interferon Cytokine Res.*, 23(6), 277-292.
16. Dafny, N., Prieto-Gomez, B., Dong, W. Q., & Reyes-Vazquez, C. (1996): Interferon modulates neuronal activity recorded from the hypothalamus, thalamus, hippocampus, amygdala and the somatosensory cortex. *Brain Res.*, 734(1-2), 269-274.

17. Finberg, R. W., & Kurt-Jones, E. A. (2004): Viruses and Toll-like receptors. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, 6(15), 1356-1360.
18. Fletcher, N. F., & McKeating, J. A. (2012): Hepatitis C virus and the brain. *J. Viral Hepat.*, 19(5), 301-306.
19. Frederiksen, K., Jat, P. S., Valtz, N., Levy, D., & McKay, R. (1988): Immortalization of precursor cells from the mammalian CNS. *Neuron*, 1(6), 439-448.
20. Friedman, R. M. (2008): Clinical uses of interferons. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 65(2), 158-162.
21. Fujigaki, H., Saito, K., Fujigaki, S., Takemura, M., Sudo, K., Ishiguro, H., & Seishima, M. (2006): The signal transducer and activator of transcription 1alpha and interferon regulatory factor 1 are not essential for the induction of indoleamine 2,3-dioxygenase by lipopolysaccharide: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappaB pathways, and synergistic effect of several proinflammatory cytokines. *J. Biochem.*, 139(4), 655-662.
22. Fusco, D. N., Brisac, C., John, S. P., Huang, Y. W., Chin, C. R., Xie, T., Zhao, H., Jilg, N., Zhang, L., Chevaliez, S., Wambua, D., Lin, W., Peng, L., Chung, R. T., & Brass, A. L. (2013): A genetic screen identifies interferon-alpha effector genes required to suppress hepatitis C virus replication. *Gastroenterology*, 144(7), 1438-1449, 1449 e1431-1439.
23. Guidotti, L. G., & Chisari, F. V. (2001): Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. *Annu. Rev. Immunol.*, 19, 65-91.
24. Haller, O., & Kochs, G. (2011): Human MxA protein: an interferon-induced dynamin-like GTPase with broad antiviral activity. *J. Interferon Cytokine Res.*, 31(1), 79-87.
25. Haroon, E., Raison, C. L., & Miller, A. H. (2012): Psychoneuroimmunology meets neuropsychopharmacology: translational implications of the impact of inflammation on behavior. *Neuropsychopharmacology*, 37(1), 137-162.
26. Heim, M. H. (2012): Interferons and hepatitis C virus. *Swiss Med. Wkly.*, 142, w13586.
27. Hoffmann, H. H., Schneider, W. M., & Rice, C. M. (2015): Interferons and viruses: an evolutionary arms race of molecular interactions. *Trends Immunol.*, 36(3), 124-138.
28. Holzapfel, B., Lucia Wickert (2007): Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). *Methoden und Anwendungsgebiete. Biologie in unserer Zeit*, 37, 120-126.
29. Homma, T., Matsukura, S., Hirose, T., Ohnishi, T., Kimura, T., Kurokawa, M., Ieki, K., Odaka, M., Suzuki, S., Watanabe, S., Sato, M., Kawaguchi, M., Schleimer, R. P., & Adachi, M. (2010): Cooperative activation of CCL5 expression by TLR3 and tumor necrosis factor-alpha or interferon-gamma through nuclear factor-kappaB or STAT-1 in airway epithelial cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 152 Suppl 1, 9-17.
30. Hoofnagle, J. H., Mullen, K. D., Jones, D. B., Rustgi, V., Di Bisceglie, A., Peters, M., Waggoner, J. G., Park, Y., & Jones, E. A. (1986): Treatment of chronic non-A,non-B hepatitis with recombinant human alpha interferon. A preliminary report. *N. Engl. J. Med.*, 315(25), 1575-1578.
31. Hoyo-Becerra, C., Huebener, A., Trippler, M., Lutterbeck, M., Liu, Z. J., Truebner, K., Bajanowski, T., Gerken, G., Hermann, D. M., & Schlaak, J. F. (2013): Concomitant interferon alpha stimulation and TLR3 activation induces neuronal expression of depression-related genes that are elevated in the brain of suicidal persons. *PLoS One*, 8(12), e83149.
32. Hoyo-Becerra, C., Liu, Z., Yao, J., Kaltwasser, B., Gerken, G., Hermann, D. M., & Schlaak, J. F. (2015): Rapid Regulation of Depression-Associated Genes in a New Mouse Model Mimicking Interferon-alpha-Related Depression in Hepatitis C Virus Infection. *Mol. Neurobiol.*, 52(1), 318-329.
33. Hoyo-Becerra, C., Schlaak, J. F., & Hermann, D. M. (2014): Insights from interferon-alpha-related depression for the pathogenesis of depression associated with inflammation. *Brain. Behav. Immun.*, 42, 222-231.

34. Huang, C. C., Duffy, K. E., San Mateo, L. R., Amegadzie, B. Y., Sarisky, R. T., & Mbow, M. L. (2006): A pathway analysis of poly(I:C)-induced global gene expression change in human peripheral blood mononuclear cells. *Physiological genomics*, 26(2), 125-133.
35. Isaacs, A., & Lindenmann, J. (1957): Virus interference. I. The interferon. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 147(927), 258-267.
36. Jackson, A. L., Bartz, S. R., Schelter, J., Kobayashi, S. V., Burchard, J., Mao, M., Li, B., Cavet, G., & Linsley, P. S. (2003): Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat. Biotechnol.*, 21(6), 635-637.
37. Kaeck, S., & Banker, G. (2006): Culturing hippocampal neurons. *Nat. Protoc.*, 1(5), 2406-2415.
38. Laasonen-Balk, T., Kuikka, J., Viinamaki, H., Husso-Saastamoinen, M., Lehtonen, J., & Tiihonen, J. (1999): Striatal dopamine transporter density in major depression. *Psychopharmacology (Berl.)*, 144(3), 282-285.
39. Lafon, M., Megret, F., Lafage, M., & Prehaud, C. (2006): The innate immune facet of brain: human neurons express TLR-3 and sense viral dsRNA. *J. Mol. Neurosci.*, 29(3), 185-194.
40. Lee, B. T., Seok, J. H., Lee, B. C., Cho, S. W., Yoon, B. J., Lee, K. U., Chae, J. H., Choi, I. G., & Ham, B. J. (2008): Neural correlates of affective processing in response to sad and angry facial stimuli in patients with major depressive disorder. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 32(3), 778-785.
41. Lepiller, Q., Soulier, E., Li, Q., Lambotin, M., Barths, J., Fuchs, D., Stoll-Keller, F., Liang, T. J., & Barth, H. (2015): Antiviral and Immunoregulatory Effects of Indoleamine-2,3-Dioxygenase in Hepatitis C Virus Infection. *J. Innate Immun.*, 7(5), 530-544.
42. Liu, W., Sheng, H., Xu, Y., Liu, Y., Lu, J., & Ni, X. (2013): Swimming exercise ameliorates depression-like behavior in chronically stressed rats: relevant to proinflammatory cytokines and IDO activation. *Behav. Brain Res.*, 242, 110-116.
43. Loftis, J. M., Huckans, M., Ruimy, S., Hinrichs, D. J., & Hauser, P. (2008): Depressive symptoms in patients with chronic hepatitis C are correlated with elevated plasma levels of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha. *Neurosci. Lett.*, 430(3), 264-268.
44. Loftis, J. M., Morasco, B. J., Menasco, D., Fuchs, D., Strater, M., & Hauser, P. (2010): Serum Serotonin Levels are Associated with Antiviral Therapy Outcomes in Patients with Chronic Hepatitis C. *Open Infect. Dis. J.*, 4, 132-141.
45. Lopez-Figueroa, A. L., Norton, C. S., Lopez-Figueroa, M. O., Armellini-Dodel, D., Burke, S., Akil, H., Lopez, J. F., & Watson, S. J. (2004): Serotonin 5-HT1A, 5-HT1B, and 5-HT2A receptor mRNA expression in subjects with major depression, bipolar disorder, and schizophrenia. *Biol. Psychiatry*, 55(3), 225-233.
46. Lowry, Oliver H., Rosebrough, Nira J., Farr, A. Lewis, & Randall, Rose J. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. *193*(1), 265-275.
47. Luu, K., Greenhill, C. J., Majoros, A., Decker, T., Jenkins, B. J., & Mansell, A. (2014): STAT1 plays a role in TLR signal transduction and inflammatory responses. *Immunol. Cell Biol.*, 92(9), 761-769.
48. Maes, M. (1999): Major depression and activation of the inflammatory response system. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 461, 25-46.
49. Maes, M. (2011): Depression is an inflammatory disease, but cell-mediated immune activation is the key component of depression. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 35(3), 664-675.
50. Maes, M., Verkerk, R., Bonaccorso, S., Ombelet, W., Bosmans, E., & Scharpe, S. (2002): Depressive and anxiety symptoms in the early puerperium are related to increased degradation of

tryptophan into kynurenine, a phenomenon which is related to immune activation. *Life Sci.*, 71(16), 1837-1848.

51. Mendez-David, I., Hen, R., Gardier, A. M., & David, D. J. (2013): Adult hippocampal neurogenesis: an actor in the antidepressant-like action. *Ann. Pharm. Fr.*, 71(3), 143-149.

52. Menegazzi, M., Mariotto, S., Dal Bosco, M., Darra, E., Vaiana, N., Shoji, K., Safwat, A. A., Marechal, J. D., Perahia, D., Suzuki, H., & Romeo, S. (2014): Direct interaction of natural and synthetic catechins with signal transducer activator of transcription 1 affects both its phosphorylation and activity. *The FEBS journal*, 281(3), 724-738.

53. Miller, Andrew H. (2009): Mechanisms of cytokine-induced behavioral changes: Psychoneuroimmunology at the translational interface. *Brain. Behav. Immun.*, 23(2), 149-158.

54. Miller, Andrew H., Maletic, Vladimir, & Raison, Charles L. (2009): Inflammation and Its Discontents: The Role of Cytokines in the Pathophysiology of Major Depression. *Biol. Psychiatry*, 65(9), 732-741.

55. Muller, N., & Schwarz, M. J. (2007): The immune-mediated alteration of serotonin and glutamate: towards an integrated view of depression. *Mol. Psychiatry*, 12(11), 988-1000.

56. Nguyen, K. B., Cousens, L. P., Doughty, L. A., Pien, G. C., Durbin, J. E., & Biron, C. A. (2000): Interferon alpha/beta-mediated inhibition and promotion of interferon gamma: STAT1 resolves a paradox. *Nat. Immunol.*, 1(1), 70-76.

57. O'Connor, J. C., Lawson, M. A., Andre, C., Moreau, M., Lestage, J., Castanon, N., Kelley, K. W., & Dantzer, R. (2009): Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase activation in mice. *Mol. Psychiatry*, 14(5), 511-522.

58. Oglodek, E. A., Szota, A., Just, M. J., Mos, D., & Araszkiewicz, A. (2014): Comparison of chemokines (CCL-5 and SDF-1), chemokine receptors (CCR-5 and CXCR-4) and IL-6 levels in patients with different severities of depression. *Pharmacol. Rep.*, 66(5), 920-926.

59. Pace, T. W., & Miller, A. H. (2009): Cytokines and glucocorticoid receptor signaling. Relevance to major depression. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1179, 86-105.

60. Persengiev, S. P., Zhu, X., & Green, M. R. (2004): Nonspecific, concentration-dependent stimulation and repression of mammalian gene expression by small interfering RNAs (siRNAs). *RNA*, 10(1), 12-18.

61. Qi, X. F., Kim, D. H., Yoon, Y. S., Jin, D., Huang, X. Z., Li, J. H., Deung, Y. K., & Lee, K. J. (2009): Essential involvement of cross-talk between IFN-gamma and TNF-alpha in CXCL10 production in human THP-1 monocytes. *J. Cell. Physiol.*, 220(3), 690-697.

62. Raison, C. L., Borisov, Andrey S., Majer, Matthias, Drake, Daniel F., Pagnoni, Giuseppe, Woolwine, Bobbi J., Vogt, Gerald J., Massung, Breanne, & Miller, Andrew H. (2009): Activation of Central Nervous System Inflammatory Pathways by Interferon-Alpha: Relationship to Monoamines and Depression. *Biol. Psychiatry*, 65(4), 296-303.

63. Raison, C. L., Capuron, L., & Miller, A. H. (2006): Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. *Trends Immunol.*, 27(1), 24-31.

64. Ramana, C. V., Chatterjee-Kishore, M., Nguyen, H., & Stark, G. R. (2000): Complex roles of Stat1 in regulating gene expression. *Oncogene*, 19(21), 2619-2627.

65. Robert-Koch-Institut (Producer). (2014). Epidemiologische Bulletin Nr. 31. Aktuelle Daten und Informationen zur Infektionskrankheiten und Public Health.

66. Sarasin-Filipowicz, M., Oakeley, E. J., Duong, F. H., Christen, V., Terracciano, L., Filipowicz, W., & Heim, M. H. (2008): Interferon signaling and treatment outcome in chronic hepatitis C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 105(19), 7034-7039.

67. Sarrazin, C., & Berg, T., Buggisch, P., Dollinger, M., Hinrichsen, H., Hüppe, D. (2015): Aktuelle Empfehlung zur Therapie der chronischen Hepatitis C. *Z. Gastroenterol.*, 53, 320-334.

68. Sarrazin, C., Berg, T., Cornberg, M., Dollinger, M., Ferenci, P., Hinrichsen, H., Klinker, H., Kraus, M., Manns, M., Mauss, S., Peck-Radosavljevic, M., Schmidt, H., Spengler, U., Wedemeyer, H., Wirth, S., & Zeuzem, S. (2012): [Expert opinion on boceprevir- and telaprevir-based triple therapies of chronic hepatitis C]. *Z. Gastroenterol.*, 50(1), 57-72.
69. Sarrazin, C., Berg, T., Buggisch, P., Dollinger, M., Hinrichsen, H., Hüppe, D. (2014): Aktuelle Empfehlung zur Therapie der chronischen Hepatitis C. Adendum zur Hepatitis C-Leitlinie.
70. Schade, C., Christoffel, G., H.Glowatz, & Schultz, A. (2007): Genexpressionsanalyse – Vollautomatische RNA-Aufreinigung mittels Spinsäulen. *Biospektrum*, 5/2007, 526-528.
71. Schaefer, M. (2002). *Neuro-Psychiatric Side Effects of Interferon-Alpha in Drug Addicts: Reasons, Frequency, and Therapy* Suchttherapie Vol. 3, pp. S72-S77. Stuttgart New York: Georg Thieme Verlag.
72. Schaefer M. and Schwaiger M. (2003): Incidence, Pathoetiology and Treatment of Interferon-Alpha Induced Neuro-Psychiatric Side Effects. *Fortschr. Neurol. Psychiatr.*, 71, 469-476.
73. Schaefer, M., Capuron, L., Friebe, A., Diez-Quevedo, C., Robaey, G., Neri, S., Foster, G. R., Kautz, A., Forton, D., & Pariente, C. M. (2012): Hepatitis C infection, antiviral treatment and mental health: a European expert consensus statement. *J. Hepatol.*, 57(6), 1379-1390.
74. Schaefer, M., Engelbrecht, M. A., Gut, O., Fiebich, B. L., Bauer, J., Schmidt, F., Grunze, H., & Lieb, K. (2002): Interferon alpha (IFNalpha) and psychiatric syndromes: a review. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 26(4), 731-746.
75. Schaefer, M., Schwaiger, M., Pich, M., Lieb, K., & Heinz, A. (2003): Neurotransmitter Changes by Interferon-Alpha and Therapeutic Implications. *Pharmacopsychiatry*, 36(S 3), 203,206.
76. Schlaak, J. F., Trippler, M., Hoyo-Becerra, C., Erim, Y., Kis, B., Wang, B., Scherbaum, N., & Gerken, G. (2012): Selective hyper-responsiveness of the interferon system in major depressive disorders and depression induced by interferon therapy. *PLoS One*, 7(6), e38668.
77. Schmitz, S. (2011). *Der Experimentator: Zellkultur*. Vol. Auflage 3, überarb. u. erg. Aufl. 2011. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; bes. s S. 224-226.
78. Schoggins, J. W. (2014): Interferon-stimulated genes: roles in viral pathogenesis. *Curr. Opin. Virol.*, 6, 40-46.
79. Schoggins, J. W., MacDuff, D. A., Imanaka, N., Gainey, M. D., Shrestha, B., Eitson, J. L., Mar, K. B., Richardson, R. B., Ratushny, A. V., Litvak, V., Dabelic, R., Manicassamy, B., Aitchison, J. D., Aderem, A., Elliott, R. M., Garcia-Sastre, A., Racaniello, V., Snijder, E. J., Yokoyama, W. M., Diamond, M. S., Virgin, H. W., & Rice, C. M. (2014): Pan-viral specificity of IFN-induced genes reveals new roles for cGAS in innate immunity. *Nature*, 505(7485), 691-695.
80. Schoggins, J. W., & Rice, C. M. (2011): Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions. *Curr. Opin. Virol.*, 1(6), 519-525.
81. Schoggins, J. W., Wilson, S. J., Panis, M., Murphy, M. Y., Jones, C. T., Bieniasz, P., & Rice, C. M. (2011): A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. *Nature*, 472(7344), 481-485.
82. Sibille, Etienne, Arango, Victoria, Galfalvy, Hanga C., Pavlidis, Paul, Erraji-Benchekroun, Loubna, Ellis, Steve P., & John Mann, J. (2004): Gene Expression Profiling of Depression and Suicide in Human Prefrontal Cortex. *Neuropsychopharmacology*, 29(2), 351-361.
83. Sledz, C. A., Holko, M., de Veer, M. J., Silverman, R. H., & Williams, B. R. (2003): Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat. Cell Biol.*, 5(9), 834-839.
84. Solis, M., Goubau, D., Romieu-Mourez, R., Genin, P., Civas, A., & Hiscott, J. (2006): Distinct functions of IRF-3 and IRF-7 in IFN-alpha gene regulation and control of anti-tumor activity in primary macrophages. *Biochem. Pharmacol.*, 72(11), 1469-1476.

85. Thomas, E., Feld, J. J., Li, Q., Hu, Z., Fried, M. W., & Liang, T. J. (2011): Ribavirin potentiates interferon action by augmenting interferon-stimulated gene induction in hepatitis C virus cell culture models. *Hepatology*, 53(1), 32-41.
86. Thurisch, Boris. (2007). RNA-Interferenz. from [http://www.boris-thurisch.de/Thurisch\\_RNA\\_Interferenz\\_2007.pdf](http://www.boris-thurisch.de/Thurisch_RNA_Interferenz_2007.pdf)
87. Vassilopoulou, K., Papathanasiou, M., Michopoulos, I., Boufidou, F., Oulis, P., Kelekis, N., Rizos, E., Nikolaou, C., Pantelis, C., Velakoulis, D., & Lykouras, L. (2013): A magnetic resonance imaging study of hippocampal, amygdala and subgenual prefrontal cortex volumes in major depression subtypes: melancholic versus psychotic depression. *J. Affect. Disord.*, 146(2), 197-204.
88. Wang, J., & Campbell, I. L. (2005): Innate STAT1-dependent genomic response of neurons to the antiviral cytokine alpha interferon. *J. Virol.*, 79(13), 8295-8302.
89. Wang, J., Campbell, I. L., & Zhang, H. (2008): Systemic interferon-alpha regulates interferon-stimulated genes in the central nervous system. *Mol. Psychiatry*, 13(3), 293-301.
90. Wang, J., Schreiber, R. D., & Campbell, I. L. (2002): STAT1 deficiency unexpectedly and markedly exacerbates the pathophysiological actions of IFN-alpha in the central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 99(25), 16209-16214.
91. Warner-Schmidt, J. L., & Duman, R. S. (2006): Hippocampal neurogenesis: opposing effects of stress and antidepressant treatment. *Hippocampus*, 16(3), 239-249.
92. Wedemeyer, H., Hardtke, S., Cornberg, M. (2012): Therapie der Hepatitis C. Aktuelle Standards und zukünftige Entwicklungen. *Chemother J*, 21, 1-7.
93. Weissenborn, K., Ennen, J. C., Bokemeyer, M., Ahl, B., Wurster, U., Tillmann, H., Trebst, C., Hecker, H., & Berding, G. (2006): Monoaminergic neurotransmission is altered in hepatitis C virus infected patients with chronic fatigue and cognitive impairment. *Gut*, 55(11), 1624-1630.
94. WHO. (2015, updated July 2015). Hepatitis C. Fact sheet N°164. from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>
95. Wichers, M. C., Kenis, G., Koek, G. H., Robaey, G., Nicolson, N. A., & Maes, M. (2007): Interferon- $\alpha$ -induced depressive symptoms are related to changes in the cytokine network but not to cortisol. *J. Psychosom. Res.*, 62(2), 207-214.
96. Wichers, M. C., Koek, G. H., Robaey, G., Verkerk, R., Scharpe, S., & Maes, M. (2005): IDO and interferon-alpha-induced depressive symptoms: a shift in hypothesis from tryptophan depletion to neurotoxicity. *Mol. Psychiatry*, 10(6), 538-544.
97. Wilkinson, J., Radkowski, M., Eschbacher, J. M., & Laskus, T. (2010): Activation of brain macrophages/microglia cells in hepatitis C infection. *Gut*, 59(10), 1394-1400.
98. Yang, J. J., Wang, N., Yang, C., Shi, J. Y., Yu, H. Y., & Hashimoto, K. (2015): Serum interleukin-6 is a predictive biomarker for ketamine's antidepressant effect in treatment-resistant patients with major depression. *Biol. Psychiatry*, 77(3), e19-20.
99. Zhu, C. B., Blakely, R. D., & Hewlett, W. A. (2006): The proinflammatory cytokines interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha activate serotonin transporters. *Neuropsychopharmacology*, 31(10), 2121-2131.

## 8 Anhang

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

BHS	Blut-Hirn-Schranke
BSA	bovines Serumalbumin
ddH <sub>2</sub> O	doppeldestilliertes Wasser
DPBS	Dubecco's phosphat buffered saline
DIV	Day In Vitro
E	embryonaler Tag
h	Stunde/n
HBSS	Hank's buffered salt solution
HCV	Hepatitis-C-Virus
HP	Hippocampus
IC	Poly (I:C)
ISG	Interferon-stimulierbare Gene
IU/ml	international units/milliliter
mIFN- $\alpha$	murines Interferon-alpha
O/N	over night, über Nacht
PBS	Phosphate buffered saline
PC	präfrontaler Kortex
PEG	Polyethylenglykol
PLL	Poly-L-Lysin
Poly (I:C)	Polyinosin:Polycytidylsäure
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	quantitative Real-Time-Polymerase-Chain-Reaction
RIPA	Radio-Immunoprecipitation Assay
Th-Zellen	T-Helferzellen, T-Lymphozyten
TBS	Tris buffered saline
TBST	Tris buffered saline and 1%Tween 20
ZNS	zentrales Nervensystem

## 8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Typ-I-IFN-Induktion und -Signalkaskade.....	10
Abbildung 1.2: IFN-Signalübertragung durch den JAK-STAT-Weg.....	13
Abbildung 1.3: Erhöhte Prävalenz von psychiatrischen Nebenwirkungen bei HCV-Infizierten.....	18
Abbildung 1.4: Übersicht der möglichen Mechanismen IFN- $\alpha$ -induzierter psychiatrischer Störungen.....	22
Abbildung 1.5: Schema der RNAi-vermittelten Genregulation.....	27
Abbildung 4.1: HT22 Zellen und ihre neuronale Spezifität.....	49
Abbildung 4.2: Bestimmung der Stimulationsbedingungen (c, t) für die Zelllinie HT22.....	50
Abbildung 4.3: Überexpression von 15 depressionsassoziierten Genen als Antwort auf die IFN-Stimulation in HT22 Zellen.....	51
Abbildung 4.4: Isoliertes embryonales Mausgehirn und Zellkultur aus primären hippocampalen und kortikalen Neuronen.....	52
Abbildung 4.5: Ermittlung der Stimulationsbedingungen für mIFN- $\alpha$ -Stimulation in murinen, hippocampalen und kortikalen Primärzellen <i>in vitro</i> .....	53
Abbildung 4.6: Dosisfindung von Poly(I:C) anhand der Expression von ISG in neuronalen Primärzellen <i>in vitro</i> .....	54
Abbildung 4.7: mIFN- $\alpha$ und Poly(I:C)-vermittelte Induktion der „Depressionsgene“ in primären, hippocampalen und kortikalen Zellen.....	56
Abbildung 4.8: mIFN- $\alpha$ /Poly(I:C)-vermittelte Zytokin-/Chemokininduktion auf Proteinebene in primären murinen, hippocampalen, HP, und kortikalen Neuronen, PC.....	57
Abbildung 4.9: Erhöhte Expressionslevel depressionsassoziiierter Zytokine/Chemokine in hippocampalen und kortikalen Neuronen nach mIFN- $\alpha$ /Poly(I:C)-Stimulation.....	58
Abbildung 4.10: Veränderte Expressionslevel der Effektormoleküle des serotonergen Systems nach mIFN- $\alpha$ /Poly(I:C)-Stimulation in hippocampalen und kortikalen Neuronen (HP/PC).....	59
Abbildung 4.11: Western-Blot von STAT1-Gesamtprotein und seiner aktiven Form während der mIFN- $\alpha$ /Poly(I:C)-Stimulation in murinen Neuronen.....	61
Abbildung 4.12: siRNA-vermittelter <i>Stat1</i> -„Knockdown“ und seine Stimulierbarkeit durch mIFN- $\alpha$ /Poly(I:C).....	63
Abbildung 4.13: STAT1-Proteinlevel in hippocampalen und kortikalen Neuronen nach STAT1-„Knockdown“ und mIFN- $\alpha$ /Poly(I:C)-Stimulation.....	64
Abbildung 4.14: Expression der „Depressionsgene“ nach STAT1-Suppression in primären hippocampalen, HP und kortikalen Neuronen, PC.....	66
Abbildung 4.15: mIFN- $\alpha$ /Poly(I:C)-vermittelte Induktion der „Depressionsgene“-Expression in STAT1-supprimierten Neuronen. Hippocampale, HP und kortikale Neuronen, PC, wurden nach dem STAT1-„Knockdown“-Experiment für weitere 24 h mit mIFN- $\alpha$ 1000 IU (mIF) und Poly(I:C) 100 $\mu$ g/ml (IC) stimuliert.....	68
Abbildung 4.16: Supprimierte Expressionslevel von proinflammatorischen und antiviralen Zytokinen nach einem STAT1-„Knockdown“.....	70
Abbildung 4.17: mIFN- $\alpha$ /Poly(I:C)-vermittelte Induktion der Expression der proinflammatorischen Zytokin-Expression in STAT1-supprimierten hippocampalen und kortikalen Neuronen (HP/PC).....	71
Abbildung 4.18: Verminderte mIFN- $\alpha$ /Poly(I:C)-Induktion der Effektormoleküle des serotonergen Systems in STAT1-supprimierten hippocampalen und kortikalen Neuronen (HP/PC).....	73



### 8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Validierte depressionsassoziierte, IFN-stimulierbare Gene.....	17
Tabelle 1.2: Psychiatrische Nebenwirkungen von IFN- $\alpha$ .....	19
Tabelle 3.1:Diverse Materialien.....	31
Tabelle 3.2: Verwendete Geräte.....	32
Tabelle 3.3: Verwendete Versuchssysteme .....	33
Tabelle 3.4: Verwendete Oligonukleotide .....	33
Tabelle 3.5: Substanzen und Puffer .....	34
Tabelle 3.6: Verwendete Größenstandards .....	36
Tabelle 3.7: Medien und Reagenzien für Zellkultur .....	36
Tabelle 3.8: Pipettierschema des Real-Time RT-PCR-Ansatzes.....	42
Tabelle 3.9: Zyklusbedingungen für quantitative Real-Time RT-PCR .....	42
Tabelle 3.10: Optimierte Transfektionsbedingungen für siRNA-vermittelte Genregulation .....	44
Tabelle 3.11: Western-Blot Antikörper und ihre Bedingungen.....	46
Tabelle 4.1: Optimierung der siRNA-Transfektionsbedingungen in hippocampalen und kortikalen Neuronen <i>in vitro</i> .....	63

## 9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Guido Gerken, dem Direktor der Klinik für Gastroenterologie und Hepatologie, für die Bereitstellung seiner Laboratorien im Medizinischen Forschungszentrum und die finanzielle Unterstützung zu dieser Dissertation bedanken. Mein besonders großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Jörg F. Schlaak für die Möglichkeit, die durch seine Ursprungsidee entstand, an dem spannenden Projektthema in seiner Arbeitsgruppe forschen zu können. Seine wissenschaftliche Anregung trug maßgeblich zur Entwicklung und Umsetzung eigener Ideen in dieser Dissertation bei.

Ganz herzlichst möchte ich Frau Dr. Carolina Hoyo-Becerra für Ihre fachliche und wissenschaftliche Unterstützung in dieser Arbeit und die sehr enge Zusammenarbeit danken. Sie stand mir stets mit einem Rat zur Seite und war immer bereit für die Diskussion meiner Ergebnisse. Ich durfte sehr viel von Ihr lernen. Außerdem bedanke mich ganz herzlich bei Ihr, für Ihr persönliches Engagement während dieser Zeit und Ihre sehr motivierende Art Situationen zu begegnen.

Ein weiterer besonderer Dank gilt Herrn Dr. Martin Trippler für seine wissenschaftlichen Anregungen und die positive Einstellung während der Entstehung dieser Dissertation. Ich bin unendlich dankbar für seine unglaubliche Ausdauer und seine Zeit, die er in die Korrektur meiner Arbeit investiert hat. Ein großer Dank gilt Frau Lena Poggenpohl für die großartige technische Unterstützung und Frau Dr. Melanie Werner für Ihren fachlichen Rat, sowie für Ihren persönlichen Einsatz während meines Mutterschutzes.

Ich danke dem gesamten Gastroenterologie-Team für die gute und erfolgreiche Zusammenarbeit. Mein großer Dank gilt ausdrücklich meinen Kolleginnen Frau Olessja Pankraz, Frau Mechthild Beste, Frau Dr. Anja Beilfuß-Zahn und Frau Sabrina Driftmann für die hilfsbereite und herzliche Arbeitsatmosphäre.

Ich bin meiner ganzen Familie unbeschreiblich dankbar. Besonders meinem Mann Martin Hübener, meiner Mutter Erna Geier und meiner Schwiegermutter Christina Hübener für den bedingungslosen Rückhalt, sowie für ihre moralische und tatkräftige Unterstützung, die mir sehr geholfen hat.

## 10 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.